

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**Mariana Aguiar de Matos**

**O EFEITO DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE EM  
COMPONENTES CELULARES E MOLECULARES RELACIONADOS À  
RESISTÊNCIA À INSULINA EM INDIVÍDUOS OBESOS**

**Diamantina**  
**2016**

**Mariana Aguiar de Matos**

**O EFEITO DO TREINAMENTO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE EM  
COMPONENTES CELULARES E MOLECULARES RELACIONADOS À  
RESISTÊNCIA À INSULINA EM INDIVÍDUOS OBESOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal dos Vales do  
Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do  
Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas, na área de Ciências Fisiológicas, como  
requisito parcial para obtenção do título de Doutora.**

**Orientador: Prof. Dr. Fabiano Trigueiro Amorim  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Etel Rocha Vieira**

**Diamantina  
2016**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

M433e

Matos, Mariana Aguiar de

O efeito do treinamento intervalado de alta intensidade em componentes celulares e moleculares relacionados à resistência à insulina de indivíduos obesos / Mariana Aguiar de Matos. – Diamantina, 2016.  
145 p. : il.

Orientador: Fabiano Trigueiro Amorim  
Coorientador: Etel Rocha Vieira

Tese (Doutorado – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Obesidade. 2. Resistência à insulina. 3. Metabolismo oxidativo.  
4. Treinamento intervalado de alta intensidade. I. Título.  
II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 616.398**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MARIANA AGUIAR DE MATOS

O efeito do treinamento intervalado de alta intensidade em componentes celulares e  
moleculares relacionados à resistência à insulina de indivíduos obesos

Tese apresentada ao PROGRAMA  
MULTICÊNTRICO DE PÓS  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS, nível de  
DOUTORADO como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutor

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Etel Rocha Vieira

Data da aprovação: 20/10/2016



Prof. Dr. MARCO FABRICIO DIAS PEIXOTO - UFVJM



Prof.ª Dr.ª DANUSA DIAS SOARES - UFMG



Prof. Dr. SAMUEL PENNA WANNER- UFMG



Dr.ª LETÍCIA MARIA DE SOUZA CORDEIRO- UFMG



Prof.ª Dr.ª ETEL ROCHA VIEIRA - UFVJM

A minha família, amor maior do mundo;

Dedico!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Deus pai, por me fortalecer a cada dia.

A minha mãe Lourdes pelo cuidado e amor incondicionais.

As minhas irmãs, meu pai e demais familiares pelo carinho e torcida em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos Maria Luiza, João Gabriel e Gabrielle, a parte mais doce da minha vida.

Ao Otávio, pelo incentivo e companheirismo durante essa jornada.

Ao meu orientador, professor Fabiano Trigueiro Amorim, pelos ensinamentos, compreensão, incentivo, otimismo e cuidado durante os últimos anos. Tenho muito orgulho em ser sua orientanda!

A professora Etel Rocha Vieira, pela orientação, ensinamentos e exemplo da profissional brilhante que és.

Ao professor Flávio de Castro Magalhães pelas valiosas contribuições em todas as etapas do estudo.

A todos os amigos do Bioex: Paula, Gabriela, Rosalina, Vinicius, Karine, Bruna, Patrícia e Patrício, pelos momentos de convivência, discussão e crescimento. Vocês são muito especiais!

A Paula, pelo incentivo e amizade.

A Karine, pela realização dos procedimentos do estresse oxidativo.

Ao Patrício e Patrícia, pela realização da contagem diferencial.

Aos alunos de iniciação científica: Kaio, Vanessa, Maksilane, Rodrigo, Bruna, Jennifer e Dênia, pelo auxílio em cada etapa da execução desse projeto. Vocês fizeram possível a realização desse estudo!

Ao professor Marco Fabrício Dias Peixoto e alunos do Letfis pela parceria nos procedimentos de Western blotting.

Ao professor Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo pela realização dos experimentos de citometria de fluxo no laboratório de imunologia e disposição para ajudar.

A professora Elizabethe Esteves pelo auxílio nas análises da ingestão alimentar.

Aos colegas dos laboratórios de imunologia (Labimuno) e fisiologia do exercício (Lafiex) pelos momentos de convivência e aprendizado.

A Valéria, pela realização do procedimento de Elisa.

A todos os colegas e professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo apoio e amizade.

Ao professor José Rodrigo Pauli e toda sua equipe, pela disponibilidade e auxílio durante a execução do Western blotting na UNICAMP.

Ao Dr. Miguel Corrêa Ponte Neves, pela realização do procedimento de biópsia muscular.

A Dr<sup>a</sup>.Cheyenne Alves Fonseca e ao Dr. Wagner Augusto Morato Cunha, pela realização da eletrocardiografia durante os testes de esforço físico.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Emílio Avelar, pela parceria na realização dos exames bioquímicos.

A Santa Casa de Caridade de Diamantina e ao Centro Especializado em Reabilitação de Diamantina, pelos espaços cedidos para a realização das coletas.

Aos voluntários da pesquisa, pelo papel essencial na realização desse estudo.

As agências de fomento FAPEMIG (CDS APQ-01621-10), CNPq (477154/2011-5) e CAPES (PNPD - 2455/2011) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O excesso de gordura corporal característico da obesidade está relacionado a diversas alterações metabólicas, que incluem a resistência à insulina. Dentre as medidas não farmacológicas empregadas para a melhora da sensibilidade à insulina está o treinamento físico aeróbio, como o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT, do inglês *high intensity interval training*). Sendo assim, esse estudo avaliou os efeitos do HIIT em componentes bioquímicos, celulares e moleculares relacionados à resistência à insulina em obesos. Indivíduos obesos sensíveis (n=9) e resistentes à insulina (n=8) foram submetidos a 8 semanas de HIIT, em cicloergômetro, realizado 3 vezes por semana, com intensidade e volume progressivos (8 a 12 estímulos; 80 a 110% da potência máxima). Amostras de sangue venoso e do músculo vasto lateral foram obtidas antes e após o programa de HIIT. Após o programa de treinamento houve aumento da sensibilidade à insulina nos obesos resistentes à insulina, mas não houve redução da massa de gordura. A concentração de citocinas no soro, o estresse oxidativo sistêmico e frequência das células imunes não foram modificadas após o treinamento. No músculo esquelético, o HIIT promoveu aumento da fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) (Tyr612), da Akt (Ser473) e da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CAMKII) (Thr286), e aumento do conteúdo da  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase ( $\beta$ -HAD) e citocromo C oxidase (COX-IV). Houve ainda, redução da fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) nos obesos resistentes à insulina. Concluímos que 8 semanas de HIIT promoveram melhora da sensibilidade à insulina, modificou componentes da via de sinalização da insulina e do metabolismo oxidativo no músculo esquelético. Essas alterações ocorreram independentes de mudanças na gordura corporal total e de parâmetros inflamatórios sistêmicos.

Palavras-chave: Obesidade. Resistência à insulina. HIIT. Via de sinalização da insulina. Proteínas quinases ativadas por mitógenos. Metabolismo oxidativo.



## ABSTRACT

Obesity is characterized by excess of body fat, and its development can lead to a variety of metabolic disorders, including insulin resistance. Exercise is recognized as a non-pharmacological approach to increasing skeletal muscle insulin sensitivity, although the mechanisms are not elucidated. Additionally, the understanding of high intensity interval training (HIIT, high intensity interval training) treat insulin resistance is less understood. Therefore, this study evaluated the effects of HIIT on biochemical, molecular, and cellular markers related to insulin resistance in sedentary obese individuals. Sensitive (n=9) and insulin resistant (n=8) obese individuals (body mass index  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) were engaged in 8 weeks of HIIT using a cycle ergometer. The HIIT was performed 3 times a week, and its intensity and volume progressively increased throughout the training period (from 8 to 12 stimuli; from 80 to 110% of the maximum power). Venous blood and the *vastus lateralis* muscle samples were obtained before and after the HIIT. HIIT enhanced insulin sensitivity in insulin-resistant obese individuals without changing body fat mass. Cytokine concentration in serum, blood oxidative stress, and frequency of some immune cells were not altered by HIIT. In skeletal muscle, HIIT increased the phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) (Tyr612), Akt (Ser473), and protein kinase dependent calcium/calmodulin (CaMKII) (Thr286). HIIT also increased the expression of  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase ( $\beta$ -HAD) and cytochrome C oxidase (COX-IV). A reduction of the kinase phosphorylation of extracellular signal-regulated (ERK1/2) was only seen in obese insulin resistant individuals. The results show that 8 weeks of HIIT enhanced insulin sensitivity, modified components of the insulin-signaling pathway, and improved skeletal muscle oxidative metabolism. These changes were independent of alterations in body fat and inflammatory parameters.

Keywords: Obesity. Insulin resistance. HIIT. Insulin signaling pathway. Mitogen-activated protein kinases. Oxidative metabolism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Via de sinalização da insulina.....	16
<b>Figura 2-</b> Grupos experimentais de acordo com o IMC e resistência à insulina.....	44
<b>Figura 3-</b> Procedimento de biópsia do músculo vasto lateral.....	51
<b>Figura 4-</b> Estratégia de análise do percentual das subpopulações linfocitárias.....	58
<b>Figura 5-</b> Estratégia para quantificação da subpopulação de monócitos.....	59
<b>Figura 6-</b> Média do percentual da frequência cardíaca máxima atingida ao final de cada estímulo de exercício intenso durante as semanas de treinamento.....	66
<b>Figura 7-</b> Efeitos do HIIT na concentração de insulina (A), HOMA- $\beta$ (B), HOMA-IR (C) e ISMI (D).....	70
<b>Figura 8-</b> Efeitos do HIIT na concentração de glicose (A) e de insulina (B) durante o teste de tolerância oral à glicose nos pontos 0, 30, 60, 90.....	71
<b>Figura 9-</b> Percentual das subpopulações de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> (A), linfócitos TD8 <sup>+</sup> (B), (C) células NK, (D) células NKT e (E) linfócitos B nos grupos CON, OB e OBR.....	77
<b>Figura 10-</b> Percentual das subpopulações de monócitos não clássicos (CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> ) (A), intermediários (CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>+</sup> ) (B) e clássicos (CD14 <sup>++</sup> CD16 <sup>-</sup> ) (C) nos grupos CON, OB e OBR.....	78
<b>Figura 11-</b> Blot representativo (A) e dados da fosforilação (B) IRS (Tyr612), (C) Akt (Ser473) e (D) AS160 (Thr642) no músculo esquelético nos grupos CON, OB e OBR.....	81
<b>Figura 12-</b> Blot representativo (A) e dados da fosforilação da JNK1/2, ERK1/2 e p38 no músculo esquelético nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino (B, C e D) .....	83
<b>Figura 13-</b> Blot representativo (A) e dados da fosforilação da p-CAMKII e conteúdo do PGC-1 $\alpha$ e Tfam no músculo esquelético nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino.....	85
<b>Figura 14-</b> Blot representativo (A) e dados do conteúdo do COX-IV e $\beta$ -HAD no músculo esquelético nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino (B e C).....	86
<b>Figura 15-</b> Blot representativo (A) e dados do conteúdo da Hsp72 no músculo.....	87
<b>Figura 16-</b> Mecanismos propostos para o desenvolvimento da resistência à insulina.....	101

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Protocolo do treinamento intervalado de alta intensidade.....	49
<b>Tabela 2-</b> Relação dos anticorpos utilizados nos experimentos de citometria.....	56
<b>Tabela 3-</b> Relação dos anticorpos utilizados para detecção das proteínas do músculo..	61
<b>Tabela 4-</b> Caracterização antropométrica e de condicionamento físico.....	64
<b>Tabela 5-</b> Caracterização metabólica dos participantes do estudo.....	65
<b>Tabela 6-</b> Análise da energia (Kcal) e composição da dieta dos participantes.....	67
<b>Tabela 7-</b> Efeito de 8 semanas de HIIT na antropometria e condicionamento físico de obesos sensíveis e resistentes à insulina.....	68
<b>Tabela 8-</b> Efeito de 8 semanas de HIIT no perfil lipídico de obesos.....	69
<b>Tabela 9-</b> Análise do estado oxidativo dos participantes do estudo.....	72
<b>Tabela 10-</b> Correlações da concentração de TBARs nos eritrócitos com variáveis bioquímicas e antropométricas.....	72
<b>Tabela 11-</b> Efeito de 8 semanas de HIIT no estado oxidativo de indivíduos sensíveis e resistentes à insulina.....	73
<b>Tabela 12-</b> Análise da concentração de citocinas no soro dos participantes do estudo..	74
<b>Tabela 13-</b> Efeito de 8 semanas de HIIT na concentração de citocinas no soro dos participantes do estudo.....	74
<b>Tabela 14-</b> Análise da contagem global e diferencial de leucócitos dos participantes do estudo.....	75
<b>Tabela 15-</b> Correlações da contagem de linfócitos com variáveis bioquímicas e antropométricas.....	75
<b>Tabela 16-</b> Efeito de 8 semanas de HIIT na contagem global e diferencial de leucócitos dos participantes do estudo.....	76
<b>Tabela 17-</b> Correlação entre a frequência dos monócitos não clássicos (CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> ) e variáveis antropométricas e bioquímicas.....	79
<b>Tabela 18-</b> Efeito de 8 semanas de HIIT na frequência das subpopulações leucocitárias de indivíduos obesos sensíveis e resistentes à insulina.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL- ácido graxo livre

AMPc- adenosina monofosfato cíclico

AMPK- proteína quinase ativada por AMP

Akt- proteína quinase B

AS160- substrato da Akt de 160 kD

BGP-15- derivado de hidroxilamina

$\beta$ HAD- $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase

$\text{Ca}^{2+}$ - cálcio

CAMKII- proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina

CAP- proteína associada a Cbl

COX-IV- citocromo C oxidase

CS- citrato sintase

CSF1- fator estimulador de colônia 1

DAG- diacilglicerol

DM2- diabetes *mellitus* do tipo 2

ERK-quinase regulada por sinal extracelular

GLUT-4- transportador de glicose 4

GPx- glutathione peroxidase

HIIT- treinamento intervalado de alta intensidade

HOMA- modelo de avaliação da homeostase

Hsp72- proteína de choque térmico 72

$\text{H}_2\text{O}_2$ - peróxido de hidrogênio

IFN- $\gamma$ -interferon-gama

IKK- quinase do inibidor do fator nuclear  $\kappa\text{B}$

IL- interleucina

IL-1Ra- antagonista do receptor da interleucina-1

IMC- índice de massa corporal

IR- receptor de insulina

IRS-1- substrato do receptor de insulina-1

JNK- quinase C-jun N-terminal

MAPK- proteína quinase ativada por mitógeno

MAPKKs- quinases das MAPKs

MCP-1- proteína quimiotática de monócitos 1

MIF-1 fator inibitório da migração de macrófagos 1

mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NF- $\kappa$ B- fator nuclear  $\kappa$ B

NK- células *natural killer*

NKT- células T *natural killer*

NRF1- fator nuclear respiratório 1

PCR- proteína C reativa

PK1-quinase dependente de fosfoinosítídeos-1

PGC $\alpha$ - coativador alfa do receptor gama do peroxissoma ativado por proliferação

PIP3–fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PI3K- fosfatidilinositol 3–quinase

PKC- proteína quinase C

PTB- domínio de ligação à fosfotirosina

Rab- proteínas reguladoras do tráfego de vesículas

ROS-espécies reativas de oxigênio

S6K- quinase p70S6

TFAM- fator de transcrição mitocondrial A

TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>40</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
5.1 Delineamento experimental.....	42
5.2 Cuidados éticos.....	42
5.3 Amostra.....	42
5.4 Análises bioquímicas.....	44
5.5 Avaliação antropométrica e da composição corporal.....	46
5.6 Avaliação do condicionamento físico.....	47
5.7 Protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade.....	48
5.8 Registro alimentar.....	49
5.9 Coleta e análise das amostras.....	50
5.9.1 Coleta.....	50
5.9.2 Análise das citocinas circulantes.....	52
5.9.3 Análise dos parâmetros do estado redox.....	52
5.9.4 Contagem leucocitária do sangue periférico.....	55
5.9.5 Análise do fenótipo de leucócitos do sangue periférico.....	56
5.9.6 Determinação do conteúdo e fosforilação de proteínas.....	59
5.9.7 Análise estatística.....	62
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>

<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>104</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO A-</b> Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	<b>139</b>
<b>ANEXO B-</b> Versão brasileira do <i>Veterans Specific Activity Questionnaire</i> .....	<b>141</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da resistência à insulina, que é caracterizada por menor resposta dos tecidos sensíveis à ação desse hormônio, como o músculo esquelético. Esse tecido é responsável por cerca de 70 a 80% da captação de glicose pós-prandial estimulada pela insulina, exercendo um importante papel no controle da homeostase glicêmica (De FRONZO *et al.*, 1981).

O mecanismo de desenvolvimento da resistência à insulina relacionada à obesidade é multifatorial, não sendo totalmente compreendido, mas algumas evidências são apontadas na literatura. A expansão do tecido adiposo e a maior infiltração de células inflamatórias nesse tecido resultam em maior liberação de ácidos graxos e de citocinas com ação pró-inflamatória, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), que por meio de receptores específicos podem atuar sobre vias de sinalização no músculo esquelético (OLEFSKY e GLASS, 2010; WISSE, 2004; HEILBRONN e CAMPBELL, 2008). Além disso, alguns estudos reportam que obesos apresentam redução da capacidade oxidativa mitocondrial atribuída à baixa densidade mitocondrial (KELLEY e HE, 2002; BOUSHEL *et al.*, 2007) e/ou prejuízo nos diferentes processos metabólicos que ocorrem nesta estrutura celular (RITOV *et al.*, 2005; MOGENSEN *et al.*, 2007), levando ao acúmulo de metabólitos lipídicos, como o diacilglicerol e ceramidas no músculo esquelético (SCHMITZ-PEIFFER *et al.*, 1997; ITANI *et al.*, 2005). Essas alterações, consequentes do excesso de gordura, podem atuar diretamente sobre componentes da via de sinalização da insulina ou ativar algumas proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) que podem inibir a via de sinalização desse hormônio (FUJISHIRO *et al.*, 2013; HIROSUMI *et al.*, 2002; CUENDA e ROUSSEAU, 2007).

Existem vários métodos que são utilizados na prevenção e/ou no tratamento da resistência à insulina em indivíduos obesos. Dentre as intervenções não farmacológicas destaca-se o treinamento físico aeróbio. Embora a melhora da sensibilidade à insulina seja um benefício bem estabelecido, os mecanismos envolvidos nessa adaptação ainda não foram totalmente elucidados. Além disso, a maioria dos indivíduos não consegue atingir os valores mínimos de atividade física recomendada: 30 minutos ou mais de atividade física, de intensidade moderada, pelo menos 5 dias por semana, ou 20 minutos de atividade física de intensidade vigorosa, pelo menos 3 dias por



semana, além das atividades da vida diária (ACSM, 2006). Dentre os obstáculos geralmente reportados para a realização de um programa de atividade física regular estão a falta de tempo, dificuldade no acesso a instalações para realização de exercícios e baixa motivação (SHERWOOD e JEFFERY, 2000; KORKIAKANGAS, ALAHUHTA, LAITINEN, 2009).

Considerando a falta de tempo como uma das principais limitações na sociedade contemporânea para a prática regular de exercício físico, surgiu um grande interesse no treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT). O HIIT trata-se de períodos de exercício intenso alternados com períodos de recuperação ativa ou repouso (HELGERUD *et al.*, 2007). Constitui uma estratégia de treinamento relativamente eficiente em termos de tempo para aumentar rapidamente a capacidade energética oxidativa e provocar remodelação fisiológica que se assemelha às mudanças normalmente promovidas pelo treinamento aeróbio contínuo de moderada intensidade (GIBALA, GILLEN e PERCIVAL, 2014). Como diversos estudos demonstram que o HIIT aumenta a sensibilidade à insulina (HOOD *et al.*, 2011; JELLEYMAN *et al.*, 2015), esse tipo de treinamento surge como uma modalidade interessante para se investigar as adaptações pelos quais o treinamento físico promove essa resposta em indivíduos obesos, considerando os mecanismos que são propostos para o desenvolvimento da resistência à insulina relacionada à obesidade.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Obesidade: epidemiologia e comorbidades

A obesidade, definida como o excesso de gordura corporal, é considerada uma epidemia mundial. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014) mostram que, em 2014, 1,9 bilhão de adultos, com 18 anos ou mais, estavam acima do peso (índice de massa corporal - IMC  $>25 \text{ kg/m}^2$ ). Destes, mais de 600 milhões de indivíduos foram classificados como obesos (IMC  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ). Segundo o estudo de Finkelstein *et al.* (2012), estima-se um aumento de 33% na prevalência da obesidade nas próximas 2 décadas.

No Brasil, de acordo com o programa nacional de monitoramento de fatores de risco e proteção para doenças crônicas não transmissíveis, realizado por meio de inquérito telefônico (VIGITEL), a frequência de excesso de peso na população adulta, em 2014, foi de 50,8%, sendo maior entre homens (54,7%) do que entre mulheres (47,4%). A frequência de adultos obesos foi de 17,5% (18% das mulheres e 16% dos homens) (BRASIL, 2014). Ao analisar os dados dos inquéritos realizados entre os anos de 2006-2013, observou-se aumento nos índices de excesso de peso e obesidade, mas uma estabilidade entre os anos de 2012-2013. Destaca-se, no entanto, que apesar dessa estabilidade mais de 50% da população adulta está acima do peso (BRASIL, 2014).

Acredita-se que mudanças no padrão alimentar e no gasto energético estejam entre os principais fatores que contribuem para a etiologia da obesidade. A mudança comportamental, no âmbito do padrão alimentar, inclui o aumento na ingestão de lipídios de origem animal, açúcares e baixo consumo de cereais e fibras (KOPELMAN, 2000). Paralelamente, a diminuição do gasto energético relacionada às atividades físicas diárias pode ser outro importante fator que contribui para o aumento da quantidade gordura em adultos nos países ocidentalizados (WEINSIER *et al.*, 1998).

A obesidade está relacionada com risco aumentado de mortalidade e morbidade por doenças cardiovasculares (MANSON *et al.*, 1990; KANNEL *et al.*, 2002 e MÁCHOVÁ *et al.*,

2007), alguns tipos de cânceres (POLESEL *et al.*, 2009; SIEGEL *et al.*, 2010, 2014) e diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) (COLDITZ *et al.*, 1990; SASAI *et al.*, 2010).

Mizuno (2010) investigou as principais comorbidades associadas à obesidade no período de 1998 a 2009, no Brasil. Essa análise foi feita a partir das informações de saúde sobre morbidade hospitalar no Sistema Único de Saúde (SUS). Em relação ao número de internações relacionadas à obesidade, observou-se um aumento contínuo com o decorrer dos anos, que passaram de 292 internações em 1998, a 37.906 internações, em 2009. Apenas a condição de obesidade foi responsável por 17% do total das internações hospitalares realizadas no sistema público de saúde ao longo do período estudado. Destaca-se que o DM2 representou a principal causa de internação atribuível à obesidade (1998 a 2009).

De acordo com Blackburn *et al.* (1995), adultos obesos têm risco de 50% a 100% maior de morte prematura em comparação com adultos com um IMC entre 20 e 25 kg/m<sup>2</sup>. Os autores ressaltam que aproximadamente 80% dos adultos com DM2 têm sobrepeso ou obesidade. Colditz *et al.* (1990) reportaram a partir de um estudo de corte prospectivo (1976-1990) que o IMC foi um preditor de risco dominante para o DM2, e mulheres que perderam mais de 5 kg reduziram o risco de DM2 em 50% ou mais.

Sugere-se que a resistência à insulina seja um fator primário no desenvolvimento do DM2. Na presença de obesidade, pode-se observar um quadro de resistência à insulina prévio ao diagnóstico do DM2. Indivíduos resistentes à insulina são inicialmente normoglicêmicos devido a produção aumentada de insulina pelo pâncreas (CEFALU, 2001). A resistência à insulina a longo prazo e a hipersecreção desse hormônio podem levar à falência das células beta pancreáticas (STUMVOLL *et al.*, 2005). Os estágios iniciais dessa falência consistem em intolerância a glicose, que pode progredir para hiperglicemia e DM2 (KALUPAHANA *et al.*, 2012).

## 2.2 Sinalização intracelular e bases moleculares da resistência à insulina

A insulina participa de vários processos celulares como o metabolismo da glicose, proteínas e lipídios, crescimento e diferenciação celular (PESSIN e SALTIEL, 2000). Na figura 1 é apresentado um esquema simplificado da via de sinalização da insulina que culmina, dentre

outros efeitos, com a captação da glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo. A sinalização intracelular da insulina inicia-se com a sua ligação ao receptor de insulina (IR), que se dimeriza e é autofosforilado, devido à sua atividade tirosina quinase intrínseca (1). Em sequência, o IR fosforila resíduos de tirosina de vários substratos proteicos, dentre esses os componentes da família dos substratos do receptor de insulina (IRS) (2). A fosforilação de resíduos de tirosina do IRS-1 cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src-2 (SH2), como a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (3). O IRS-1 fosforilado associa-se com a subunidade regulatória p85 da PI3K e essa interação recruta a subunidade catalítica p110 da PI3K para a membrana plasmática, resultando na formação do segundo mensageiro fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) (4). Como resultado, ocorre a ativação da quinase dependente de fosfoinosítídeos-1 (PDK1) (5), que promove a ativação da proteína quinase B (Akt/PKB) por meio da fosforilação de um resíduo de treonina em seu sítio ativo (6). A Akt/PKB ativada fosforila e inativa seu substrato de 160 kD (AS160) (7), uma proteína que apresenta um domínio GAP (proteínas ativadoras de GTPases) específico para proteínas reguladoras do tráfego de vesículas (Rab). Quando o domínio GAP da AS160 é inibido, ocorre a conversão das Rabs em suas formas ativas levando a reorganização do citoesqueleto e translocação do GLUT-4 para a membrana da célula, ocorrendo assim a captação de glicose pelas células dos tecidos adiposo e muscular (8).

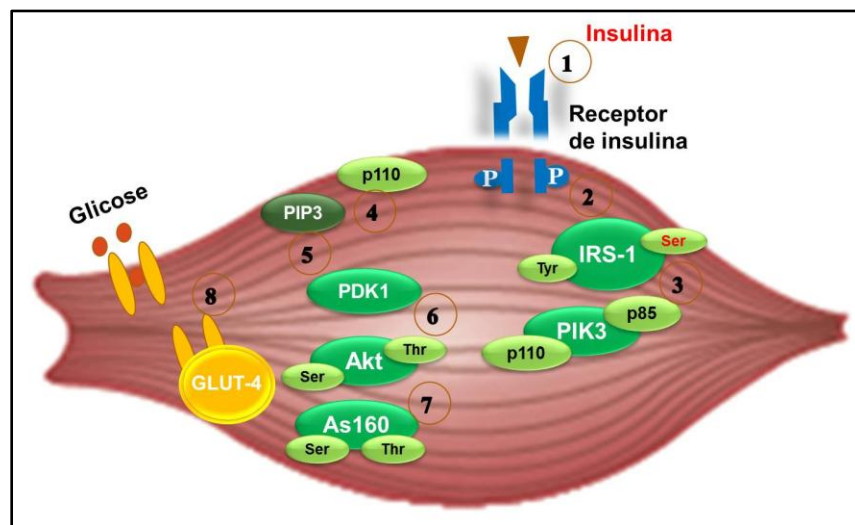


Figura 1- Representação da via de sinalização intracelular da insulina no músculo esquelético. Fonte: ilustração da autora.

Na ocorrência de alterações em qualquer etapa dessa sinalização, a insulina não exerce sua função adequadamente, o que caracteriza o quadro de resistência à insulina, no qual as concentrações fisiológicas desse hormônio não são suficientes para induzir seus efeitos metabólicos. Como consequência, ocorre uma hiperinsulinemia para manter a captação de glicose pelos tecidos muscular e adiposo, reduzir a glicogênese hepática e liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo. Contudo, essa hiperinsulinemia não é mantida a longo prazo, sendo seguida pela falência das células beta pancreáticas (SCHENK *et al.*, 2008; STUMVOLL *et al.*, 2005).

Dentre as diversas alterações da via de sinalização da insulina, que desencadeiam a resistência à insulina, destaca-se a fosforilação de resíduos de serina/treonina dos IRS (TANIGUCHI, EMANUELLI e KAHN, 2006). Existem mais de 50 resíduos de serina/treonina no IRS-1 que podem ser fosforilados e regular negativamente a sinalização da insulina. Alguns estudos têm demonstrado a fosforilação no IRS-1 nos resíduos de Ser302, Ser307, Ser612 e Ser632 em diversos modelos de resistência a insulina (KIM *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2002.; UM *etal.*, 2004; FURUKAWA *et al.*, 2005; MORINO *et al.*, 2005). Com base em estudos *in vitro*, a fosforilação de resíduos de serina pode conduzir à dissociação entre o receptor de insulina e o IRS-1 e/ou do IRS-1 e a PI3K, inibindo a ativação da PI3K (MOTHE *et al.*, 1996; AGUIRRE *et al.*, 2002; MOESCHEL *et al.*, 2004; LI *et al.*, 1999) ou ainda aumentar a degradação do IRS-1 (EGAWA *et al.*, 2000).

Recentemente, Hancer *et al.* (2014), a partir de experimentos *in vitro*, induziram um quadro de estresse metabólico por drogas específicas. Essas substâncias promoveram a fosforilação de quinases relacionadas ao estresse celular que atuam inibindo a via de sinalização da insulina. Os autores observaram que diversos resíduos de serina/treonina do IRS (Ser 302, Ser 307, Ser318, Ser325 e Ser 346) são fosforilados pelo estresse metabólico e também na presença de insulina. Segundo os autores, esse hormônio tem uma contribuição importante na fosforilação dos resíduos de serina/treonina do IRS, uma vez que, a maioria dos resíduos foi fosforilado na presença de insulina. Esse dado sugere que a fosforilação de serina/treonina do IRS funciona como um mecanismo de feedback que se desenvolve durante a estimulação da insulina, mas que este mecanismo pode ser cooptado pelo estresse metabólico, como o estresse do retículo endoplasmático ou inflamação, inibindo a sinalização da insulina e promovendo alterações metabólicas (COPPS e WHITE, 2012; GIRAUD *et al.* 2007).

Diversos estudos demonstram também o papel das MAPKs no desenvolvimento da resistência à insulina (FUJISHIRO *et al.*, 2013; HIROSUMI *et al.*, 2002; CUENDA e ROUSSEAU, 2007). Essa família de proteínas regula diversas funções celulares incluindo a proliferação celular, diferenciação, migração e a apoptose. Em mamíferos, dentre os subgrupos principais da família das MAPKs estão as quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), quinase C-Jun N-terminal (JNK) e a p38 (PEARSON *et al.*, 2001; CHANG e KARIN, 2001).

Fujishiro *et al.* (2013) a partir de ensaio *in vitro* com adipócitos 3T3-L1 sugerem que a ativação crônica da ERK1, p38 ou JNK pode induzir resistência à insulina por afetar a sinalização da insulina e o conteúdo do GLUT4. Os resultados desse estudo demonstraram que cada MAPK promove essas alterações por mecanismos distintos. A ativação da ERK1 inibiu a expressão do IR e do IRS1/2, como resultado a fosforilação induzida pela insulina da tirosina do IRS1/2 e a ativação da PI3K ficaram prejudicadas. A ativação da p38 reduziu apenas moderadamente a expressão IRS1/2. E por fim, a ativação JNK não teve nenhum efeito sobre a expressão do IRS1/2, mas suprimiu a fosforilação da tirosina de ambos e, por sua vez, a ativação de PI3K e da Akt.

Outros estudos reportaram uma associação entre a ativação da JNK1 e a fosforilação de serina/treonina do IRS1/2 (SOLINAS *et al.*, 2006; HIROSUMI *et al.*, 2002; SABIO *et al.*, 2010). Chung *et al.* (2008) reportaram uma maior ativação da JNK1/2 no músculo esquelético de indivíduos obesos resistentes à insulina comparados com indivíduos eutróficos saudáveis. Similarmente, nós recentemente observamos maior ativação dessa quinase no músculo esquelético de indivíduos obesos com e sem resistência à insulina comparados com indivíduos eutróficos saudáveis, sendo que essa ativação foi acentuada quando os obesos eram resistentes à insulina (MATOS *et al.*, 2014). A JNK pode ser ativada por diversos estímulos, como citocinas inflamatórias, ácidos graxos livres (AGL), espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse do retículo endoplasmático (VALLERIE e HOTAMISLIGI, 2010).

Bost *et al.* (2005) reportaram que camundongos ERK1<sup>-/-</sup> foram protegidos contra a obesidade quando alimentados com uma dieta hiperlipídica, o que foi relacionado à diminuição na adipogênese e aumento no gasto energético pós-prandial. No estudo de Jager *et al.* (2011) foi observado que camundongos ERK1<sup>-/-</sup> foram protegidos do desenvolvimento da resistência à

insulina e inflamação do tecido adiposo, sem quaisquer alterações na obesidade. Demonstrando dessa forma, que a inibição da ERK protege contra a resistência à insulina independente do peso corporal.

Foi demonstrado ainda que a ativação em adipócitos da ERK1/2 por citocinas inflamatórias, especialmente a IL-1 $\beta$ , também induziu uma diminuição da transcrição do mRNA do IRS-1, conduzindo a um decréscimo na sinalização da insulina e no transporte de glicose (JAGER *et al.*, 2007). Bouzakri *et al.* (2003), a partir de culturas primárias do músculo esquelético de indivíduos DM2, observaram no estado basal maior fosforilação da ERK1/2 e da serina 636 do IRS1. Posteriormente, as células musculares foram expostas a um inibidor dessa quinase (PD98059), o que reduziu a fosforilação basal do IRS-1 (Ser636). Além disso, no estudo de Engelman *et al.* (2000) foi demonstrado que, em adipócitos 3T3-L1, as ERK1/2 são mediadoras da fosforilação da serina do IRS1 induzida pelo TNF- $\alpha$ .

A p38 regula a síntese de citocinas pró-inflamatórias e está envolvida nas vias de transdução de sinalização ativadas por citocinas (CUENDA e ROUSSEAU, 2007). Carlson *et al.* (2003) observaram em adipócitos isolados de indivíduos diabéticos aumento da fosforilação da p38 e que a regulação positiva dessa proteína contribuiu para a perda da expressão do GLUT4. Foi reportado que na presença de inibidores da p38 a redução da expressão do GLUT4 foi atenuada. Adicionalmente, Jheng *et al.* (2013) observaram que a fosforilação da p38 era maior no músculo esquelético de camundongos *ob/ob* comparados com animais controle. Por outro lado, no estudo de Brown *et al.* (2014) foi demonstrado, a partir da análise de miotubos de diabéticos que a inibição da atividade da p38 diminuiu significativamente a expressão de genes de citocinas inflamatórias, mas não melhorou a captação de glicose estimulada pela insulina.

Esses estudos demonstram, portanto, que uma série de fatores/estímulos pode levar à ativação de MAPKs, como por exemplo, citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e intermediários do metabolismo lipídico, fatores estes que estão presentes e/ou alterados na obesidade, estabelecendo relação entre a obesidade e a resistência à insulina.

### 2.2.1 Inflamação crônica de baixo grau na obesidade e resistência à insulina

A obesidade é caracterizada pela presença de uma inflamação crônica de baixo grau, que parece ser iniciada no tecido adiposo. A expansão desse tecido é acompanhada por maior infiltração de células inflamatórias. Xu *et al.* (2003) reportaram, por exemplo, que genes relacionados a inflamação como a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófago 1 (MIP-1 $\alpha$ ) e antígeno do macrófago-1 (MAC-1) são superexpressos no tecido adiposo de animais com obesidade induzida geneticamente ou por dieta hiperlipídica. Dentre as células que infiltram o tecido adiposo, os macrófagos são funcional e numericamente dominantes (JUSTIN *et al.*, 2007; ODEGAARD e CHAWLA, 2011). Em animais eutróficos, aproximadamente 10 a 15% das células do tecido adiposo expressam o marcador de macrófagos F4/80, enquanto 45 a 60% das células no tecido adiposo de animais obesos são F4/80<sup>+</sup>, indicando que a obesidade substancialmente altera a relação macrófagos/adipócitos (WEISBERG *et al.*, 2003; CINTI *et al.*, 2005).

Como revisado por Heilbronn e Campbell (2008), inúmeras teorias têm sido propostas para explicar a maior infiltração de macrófagos no tecido adiposo de obesos. Estudos realizados em animais mostram que o aumento da massa do tecido adiposo, sem um aumento concomitante no suporte vascular pode provocar hipóxia tecidual e, consequentemente, morte celular. Como resultado ocorre ativação do fator induzível por hipóxia 1 (HF1) e de genes inflamatórios (YE *et al.*, 2007), que funcionam como um gatilho para a inflamação do tecido adiposo. Além disso, acredita-se que o recrutamento de macrófagos ocorra em resposta à sinalização alterada de adipocinas: redução da adiponectina e aumento da leptina e de fatores envolvidos no recrutamento de macrófagos como o fator estimulador de colônia-1 (CSF-1), MCP-1 e fator inibitório da migração de macrófagos 1 (MIF-1) (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005; XU *et al.*, 2003).

A obesidade parece estar associada não apenas ao aumento do número de macrófagos no tecido adiposo (CANCELOO *et al.*, 2005), mas também à mudança no estado de ativação destas células do fenótipo M2 para M1. Os macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , assim como, interleucinas 12 e 23 (IL-12 e IL-23), e derivados oxidativos do óxido nítrico e do oxigênio. Já as células de fenótipo M2 apresentam um perfil menos



inflamatório, expressam arginase e produzem maiores quantidades de interleucina 10 (IL-10) e de antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1Ra), e quantidades menores de IL-12 e IL-23 (MANTOVANI *et al.*, 2005; NGUYEN *et al.*, 2005).

Aron-Wisniewsky *et al.* (2009) demonstraram que a frequência de macrófagos M1 no tecido adiposo subcutâneo de indivíduos com obesidade mórbida é 4 vezes maior comparado com indivíduos eutróficos, e que a perda de massa corporal resulta em uma concomitante redução de macrófagos M1 e aumento de células M2. A aquisição e manutenção do fenótipo M1 em macrófagos recrutados para o tecido adiposo em animais obesos parecem envolver uma série de mediadores como as adipocinas, condições de hipóxia, presença de lipopolissacarídeo (LPS) e ácidos graxos (NGUYEN *et al.*, 2005; MURDOCH *et al.*, 2008; ANTUNA-PUENTE *et al.*, 2008).

A participação de outras células inflamatórias tem sido investigada, como os linfócitos T auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ) e citotóxicos ( $CD3^+CD8^+$ ). Nishimura *et al.* (2009) observaram, em animais com obesidade induzida por uma dieta rica em gordura, um grande número de linfócitos T citotóxicos infiltrados no tecido adiposo epididimal, enquanto que o número de linfócitos auxiliares e células T reguladoras estavam diminuídas. Estes autores observaram ainda que o acúmulo de células T  $CD8^+$  precedia a infiltração de macrófagos, e dessa forma, as células T  $CD8^+$  teriam um papel essencial na iniciação e propagação da inflamação do tecido adiposo. Essas alterações favorecem a produção de citocinas pró-inflamatórias, que poderiam desempenhar um papel importante na determinação do fenótipo M1-M2 dos macrófagos do tecido adiposo (KALUPAHANA *et al.*, 2012).

A associação entre inflamação e resistência à insulina não se restringe ao tecido adiposo e é observada em outros tecidos-alvo da insulina. Patsouris *et al.* (2014) verificaram que a inflamação no músculo esquelético observada pelo aumento de marcadores de macrófagos nesse tecido está associada com a resistência à insulina em camundongos *ob/ob* e indivíduos obesos portadores ou não de DM2. Foi também demonstrado que a exposição de miotubos C2C12 ao ácido palmítico elevou a produção da MCP-1 e que a superexpressão músculo-específica dessa quimiocina em camundongos transgênicos induziu o recrutamento local de macrófagos e alterou a sensibilidade local à insulina.

O'Rourke *et al.* (2005) avaliaram a frequência de diferentes subpopulações leucocitárias em células mononucleares do sangue periférico e reportaram uma maior frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e redução na frequência de linfócitos TCD8<sup>+</sup>, ao se comparar indivíduos obesos (IMC  $\geq$  35) com eutróficos. Weerd *et al.* (2012), ao analisarem a frequência de células T CD4<sup>+</sup>, encontraram aumento dessas nos indivíduos obesos mórbidos e não reportaram diferença na frequência das células TCD8<sup>+</sup>.

Trabalhos recentes mostram que os linfócitos B também podem participar da fisiopatologia da obesidade e resistência à insulina. Dados de Winer *et al.* (2011) suportam um modelo no qual o recrutamento inicial de linfócitos B para o tecido adiposo promove a ativação de células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias que potenciam a polarização dos macrófagos para fenótipo M1 e a resistência à insulina. DeFuria *et al.* (2013) também demonstraram, a partir de estudos em animais e em humanos, que as células B são reguladoras importantes da inflamação em DM2 devido à sua capacidade de ativar diretamente a função pró-inflamatória das células T e secretarem um perfil de citocinas pró-inflamatórias.

Os resultados dos estudos quanto o papel das células T *natural killer* (NKT) no desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina são divergentes. Alguns estudos reportam que a deficiência das células NKT tem efeitos mínimos sobre o desenvolvimento da resistência à insulina (WU *et al.*, 2012; SCHIPPER *et al.*, 2012). Já Lynch *et al.* (2012) encontraram que animais com deficiência das células NKT ganharam mais peso que os controles selvagens ou animais que receberam dieta com alto teor de gordura. De acordo com uma recente revisão (WU e KAER, 2013), existe forte evidência de que as NKT são uma das primeiras células que são ativadas em resposta ao excesso de lipídios e podem contribuir para a inflamação de baixo grau que está associada com a obesidade e influenciar o desenvolvimento de doenças metabólicas.

Adicionalmente, alguns estudos avaliaram a frequência de outra subpopulação de leucócitos circulantes em obesos, os monócitos. Essas células apresentam grande diversidade fenotípica e funcional (GRAGE-GRIEBENOW *et al.*, 2001). A diferença da expressão do co-receptor de LPS (CD14) e do receptor de FC tipo III (CD16) tem sido utilizada para distinguir as diferentes populações de monócitos (PASSLICK *et al.*, 1989). Aproximadamente 90% dos monócitos consistem em células CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, denominados monócitos clássicos. O restante consiste em outras duas subpopulações que expressam CD16, mas têm diferentes níveis de

expressão de CD14: monócitos intermediários ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) e monócitos não clássicos ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ) (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Uma maior frequência de monócitos  $CD16^{+}$  tem sido reportada em diferentes doenças, principalmente em infecções ou condições inflamatórias (FINGERLE *et al.*, 1993; KAWANAKA *et al.*, 2002; CASTANO *et al.*, 2011). Essa subpopulação ( $CD16^{+}$ ) é geralmente denominada de monócitos inflamatórios em função da capacidade de produzir quantidades elevadas de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (FRANKENBERGER *et al.*, 1996; BELGE *et al.*, 2002). No estudo da Poitou *et al.*, (2011) foi reportado que a frequência das subpopulações de monócitos  $CD16^{+}$  (intermediários e não clássicos) é aumentada em obesos, com um incremento maior da subpopulação  $CD14^{+}CD16^{++}$  em obesos diabéticos. Similarmente, nós observamos maior frequência das células  $CD14^{++}CD16^{+}$  em obesos resistentes à insulina (MATOS *et al.*, 2016).

A maior infiltração de leucócitos no tecido adiposo, juntamente com a atividade secretória dos adipócitos culminam em maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias na presença de obesidade (TRAYHURN e WOOD, 2004; ROSEN e SPIEGELMAN, 2006). Diversos estudos mostram aumento de peptídeos pró-inflamatórios no tecido adiposo e na circulação na obesidade. Hotamisligil *et al.* (1995) observaram que indivíduos obesos expressavam 2,5 vezes mais o mRNA para TNF- $\alpha$  no tecido adiposo quando comparados à indivíduos magros. Neste contexto, Dandona *et al.* (1998) observaram concentrações plasmáticas aumentados de TNF- $\alpha$  em obesos, que foram reduzidos após perda de peso corporal. Já Park *et al.* (2005) também verificaram que indivíduos obesos apresentavam valores plasmáticos aumentados de TNF- $\alpha$  e de outros agentes pró-inflamatórios, como proteína C reativa (PCR) e IL-6.

O papel das citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento da resistência à insulina induzida pela obesidade foi reportado por alguns autores (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993, 1994, 1995; KAMEI *et al.*, 2006; SELL *et al.*, 2009). De acordo com Hotamisligil *et al.* (1996) o TNF- $\alpha$  pode levar à fosforilação de resíduos de serina do IRS1 e interferir com a fosforilação da tirosina e a propagação do sinal pela via da insulina. Del Aquila *et al.* (1999) demonstraram que o aumento do TNF- $\alpha$  promoveu resistência a insulina em células musculares C2C12, evidenciada pela inibição da ativação da PI3K mediada pelo IRS1/2. Adicionalmente, o TNF- $\alpha$  pode ativar as quinases inibidoras da via da insulina como a JNK e a p38 (AGGARWAL, 2003; SCHENK *et al.*, 2008).

Haghani *et al.* (2015) avaliaram o papel do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento da resistência à insulina induzida pelo palmitato em células musculares C2C12. Nas células *knockdown* para o TNF- $\alpha$  mesmo na presença de palmitato, a captação da glicose estimulada pela insulina foi mantida, assim como a fosforilação do IRS-1 (Tyr632) e da Akt (Ser473). Outros estudos também reportaram que a exposição de culturas primárias de células musculares humanas ao TNF- $\alpha$  promove resistência à insulina (AUSTIN *et al.*, 2008; BOUZAKRI e ZIERATH, 2007).

Outra citocina descrita por estar envolvida no mecanismo de desenvolvimento da resistência à insulina é a IL-1 $\beta$ . Após se ligar ao seu receptor, IL-1R, a IL-1 $\beta$  induz a ativação das MAPKs JNK e p38, que sinergicamente aumentam a expressão de genes alvo de outras interleucinas, tais como IL-6, interleucina-8 (IL-8), MCP-1, ciclo-oxigenase 2 (COX-2), IL-1 $\beta$  e fosfatase MAPK 1 (MKP-1) por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (SOLINAS e KARIN, 2010; GARLANDA *et al.*, 2013). Assim, a ativação destas quinases não só conduz à produção de diversos fatores pró-inflamatórios, como também irá interferir na sinalização da insulina.

Adicionalmente, a partir de estudos *in vivo* e *in vitro* foi observado que a exposição prolongada de adipócitos à IL-1 $\beta$  diminuiu a expressão do GLUT4 e inibiu marcadamente a sua translocação para a membrana plasmática, em resposta à insulina. Este efeito inibitório foi associado a uma diminuição dos níveis do IRS-1. A diminuição da expressão do IRS-1 resultou em alteração da ativação da Akt/PKB induzida pela insulina e da fosforilação da AS160 (JAGER *et al.*, 2007).

De acordo com De Filippo *et al.* (2015), as concentrações plasmáticas da IL-6 apresentaram correlação não somente com o índice de massa corporal, mas também com o modelo de avaliação homeostática da resistência à insulina (HOMA-IR), índice de resistência à insulina, em crianças e adolescentes obesos. A IL-6 pode desencadear a ativação da JNK e aumento da atividade da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) (SENN *et al.*, 2002; ROTTER *et al.*, 2003; NIETO-VAZQUEZ *et al.*, 2008), que inibem a sinalização da insulina.

Jove *et al.* (2005) reportaram que em culturas de mioblastos C2C12 de camundongos a exposição ao palmitato aumenta a produção de IL-6 em paralelo a redução da captação de glicose dependente da insulina, e esses efeitos são revertidos ao se adicionar anticorpo anti-IL-6 nas

culturas. Nieto-Vazquez *et al.* (2008), a partir de estudos *in vitro* identificaram um duplo papel da IL-6 em regular a sensibilidade à insulina. Essa citocina pode potencializar a ação da insulina sobre a captação de glicose muscular, mas pode causar resistência à insulina após a exposição prolongada, prejudicando a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática e promovendo defeitos na sinalização da insulina no nível do IRS-1. Dessa forma, o papel da IL-6 na sensibilidade à insulina é considerado em algumas situações paradoxo.

Esses estudos demonstram que a obesidade é acompanhada por alterações importantes no número e no fenótipo dos leucócitos. E que essas células juntamente com os adipócitos são fonte de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, estão relacionadas ao desenvolvimento da resistência à insulina por meio da inibição da via de sinalização desse hormônio.

#### 2.2.2 Papel do estresse oxidativo na obesidade e resistência à insulina

As espécies reativas de oxigênio (ROS) incluem os radicais livres, como o ânion superóxido e espécies não radicalares, como a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (CHEESEMAN e SLATER, 1993). Em células de mamíferos, as espécies reativas podem ser geradas em diferentes compartimentos celulares, tais como membrana citoplasmática, mitocôndrias, retículo endoplasmático (RE), lisossomas e peroxissomas. Essas espécies surgem como subprodutos naturais do metabolismo, e desempenham um papel em diversas cascatas de sinalização, fagocitose, função endotelial e função dos neutrófilos.

A geração de espécies reativas em excesso está associada a lesões celulares como a peroxidação de lipídeos, a oxidação de proteínas, danos ao DNA, inativação enzimática e ativação excessiva de genes pró-inflamatórios (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010; FERRARI, FRANÇA e HONORIO-FRANÇA, 2009). Dessa forma, para manter um nível fisiológico de espécies reativas é necessária a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes. Os antioxidantes são moléculas enzimáticas (superóxido dismutase, tioredoxina, catalase e glutathione peroxidase) e não enzimáticas (vitaminas, carotenóides, flavonóides) que retardam ou impedem o dano oxidante das espécies reativas de oxigênio por meio da inibição da sua formação e ação ou

por reparação dos componentes celulares que foram danificados (YOUNG e WOODSIDE, 2001). Um desequilíbrio entre a geração das espécies reativas e ação dos sistemas antioxidantes caracteriza o processo de estresse oxidativo, que pode ocorrer por elevada velocidade de produção das espécies reativas, diminuição nos níveis de antioxidantes ou uma combinação de ambas as condições (WINTERBOURN, 2008).

De acordo com alguns estudos, a obesidade está relacionada ao estresse oxidativo (ROSEN *et al.*, 2001; WEST, 2000; URAKAWA *et al.*, 2003). Dentre os mecanismos que podem gerar estresse oxidativo na obesidade estão a hiperglicemia, altas concentrações de AGL, hiperinsulinemia, defesa antioxidante inadequada, excessiva infiltração e ativação leucocitária e inflamação crônica (EVANS *et al.*, 2003; FACCHINI *et al.*, 2000; INOUCHI *et al.*, 2000; FURUKAWA *et al.*, 2004). A interação de alguns ou até todos esses fatores contribuem para o estresse oxidativo na obesidade.

Várias evidências sugerem que o acúmulo de gordura está correlacionado com elevado estado de estresse oxidativo. Olusi (2002) avaliou a peroxidação lipídica no plasma e a atividade enzimática da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase em indivíduos obesos. O principal achado desse estudo foi que a obesidade, na ausência de tabagismo, DM2, hiperlipidemia, doença renal ou hepática provoca a peroxidação lipídica e diminuição da atividade das enzimas citoprotetoras. Outros estudos também reportam o aumento da peroxidação lipídica no plasma em indivíduos obesos (CABRERA *et al.*, 2010; RONCOLETA, 2012).

Altas taxas de oxidação associada à obesidade não se limitam apenas ao plasma, mas são também encontradas em diferentes tecidos. No estudo Frohnert *et al.* (2011) foi observado que a carbonilação de proteínas no tecido adiposo subcutâneo de humanos está diretamente relacionada ao IMC e às concentrações séricas de ácidos graxos. Já Russela *et al.* (2003) reportaram aumento da peroxidação lipídica, quantificada pelo 4-hidroxinonenal, no músculo esquelético de indivíduos obesos comparados com eutróficos.

A oxidação de lipídios e proteínas na membrana pode causar inibição de cascatas de sinalização, disfunção enzimática, inflamação, danos à membrana celular, aos receptores de membrana, ao DNA e ácidos nucleicos e causar a morte celular (MARITIM *et al.*, 2003). Assim, diversos estudos, utilizando modelos de tecido *ex vivo* e cultura de células, têm demonstrado que

o estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento da resistência à insulina no músculo esquelético. Dokken *et al.* (2008) avaliaram as ações moleculares do estresse oxidativo de baixo grau sobre a sinalização da insulina e transporte de glicose no músculo esquelético isolado de ratos Zucker magros. Os resultados indicaram que o estresse oxidativo pode direta e rapidamente induzir resistência à insulina no músculo esquelético, caracterizada por alterações na sinalização da insulina, no transporte de glicose e na síntese de glicogênio. Adicionalmente, Singh *et al.* (2008) reportaram que quando miotubos L6 eram expostos à glicose oxidase (catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio-  $H_2O_2$ ) houve redução da captação de glicose estimulada pela insulina. Quando essas células foram expostas ao antioxidante gama-tocoferol, a captação de glicose foi restaurada, reforçando a evidência da participação do estresse oxidativo no desenvolvimento da resistência à insulina.

Ainda não está claro como o estresse oxidativo provoca resistência à insulina, embora alguns mecanismos sejam propostos. O mecanismo mais comumente sugerido envolve as MAPKs. Archuleta *et al.* (2009), a partir de estudos *in vitro* com células musculares isoladas de ratos Zucker magros, observaram que a exposição dessas células ao  $H_2O_2$  promoveu redução do transporte de glicose estimulado pela insulina. Essa alteração foi associada à perda seletiva das proteínas IRS1 e IRS2, aumento da fosforilação do IRS (ser307) e redução da fosforilação da Akt (ser473). Adicionalmente, Blair *et al.* (2006) reportaram que quando células L6 são expostas agudamente ao  $H_2O_2$ , ocorre ativação da p38 com coincidente inibição da ação da insulina. Além disso, os efeitos induzidos pelo  $H_2O_2$  foram antagonizados por dois inibidores sintéticos da p38.

Como revisado por Solinas e Karin (2010), outras MAPKs podem ser ativadas pelo estresse oxidativo no músculo esquelético. A JNK1, por exemplo, pode ser ativada por ROS e estresse do retículo endoplasmático (KAMATA *et al.*, 2005; ZHANG e KAUFMAN, 2008). Sabe-se que essas proteínas quinases podem atuar inibindo a sinalização da insulina e dessa forma, o estresse oxidativo parece ser outro fator desencadeante da resistência à insulina no contexto da obesidade.

### 2.2.3 Disfunção mitocondrial e prejuízo ao metabolismo oxidativo

De acordo com alguns autores o conteúdo e/ou a capacidade oxidativa mitocondriais são reduzidos em indivíduos obesos resistentes à insulina e com DM2 (HOLLOWAY *et al.*, 2007; SCHRAUWEN-HINDERLING *et al.*, 2007), sugerindo que a disfunção mitocondrial pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia da resistência à insulina. Algumas das primeiras observações de que a redução da capacidade e/ou da função mitocondrial estariam associadas com a resistência à insulina foram feitas no músculo esquelético. Foi observado que pacientes com miopatias mitocondriais também apresentavam resistência periférica à insulina e intolerância à glicose, além de fenocópia de uma série de aspectos presentes no músculo esquelético no estado diabético, como acúmulo de lipídios (KADOWAKI *et al.*, 1994; BECKER, LAUBE e DAMIAN, 2002).

Em meados da década de 90 observou-se, pela primeira vez, que o músculo esquelético de pacientes com DM2 era caracterizado por prejuízo na capacidade de oxidar glicose (KELLEY *et al.*, 1993) e lipídios (KELLEY e SIMONEAU, 1994), o que foi relacionado com a reduzida capacidade oxidativa mitocondrial (SIMONEAU e KELLEY, 1997). A constatação de que o DM2 está associado a esse prejuízo foi reforçada em vários estudos em humanos e animais. Essa redução da capacidade oxidativa mitocondrial é atribuída à baixa densidade mitocondrial (KELLEY e HE, 2002; BOUSHEL *et al.*, 2007) e/ou baixa capacidade oxidativa das mitocôndrias, relacionada aos diferentes processos metabólicos que ocorrem nesta organela celular ( $\beta$ -oxidação, ciclo de Krebs e cadeia respiratória mitocondrial) (RITOV *et al.*, 2005; MOGENSEN *et al.*, 2007).

Em relação à capacidade oxidativa das mitocôndrias, Simoneau *et al.* (1999) e Kim *et al.* (2000) demonstraram redução de aproximadamente 35% na atividade da enzima carnitina palmitoil transferase-1 no músculo esquelético de obesos. Isso implica na diminuição do transporte de ácidos graxos de cadeia longa através da membrana da mitocôndria, e consequentemente na diminuição dos substratos para a  $\beta$ -oxidação. Após a entrada dos ácidos graxos na mitocôndria, o passo seguinte no metabolismo oxidativo é a  $\beta$ -oxidação, em que uma das enzimas envolvidas é a  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase ( $\beta$ -HAD). Estudos demonstram



reduzida atividade da  $\beta$ -HAD em indivíduos obesos (KIM *et al.*, 2000, KIENS, 2006). O mesmo é verificado com a atividade da enzima citrato sintase (CS), enzima chave do ciclo de Krebs (KELLEY *et al.*, 2002, SIMONEAU *et al.*, 1999).

Além disso, tem-se reportado diminuição da atividade da cadeia transportadora de elétrons, comprovada pela redução da expressão da NADH: $O_2$  oxido-redutase (Complexo I) (KELLEY *et al.*, 2002), succinato desidrogenase (Complexo II) (RITOV *et al.*, 2005) e citocromo C oxidase (COX- IV) (SIMONEAU *et al.*, 1999). No estudo de Ritov *et al.* (2005), os autores observaram redução na atividade da cadeia de transporte de elétrons da fração mitocondrial subsarcolemal do músculo esquelético de pacientes obesos e com DM2. Embora o conteúdo mitocondrial, medido pelo DNA mitocondrial (DNAm), ter sido menor em ambos os grupos, acredita-se que essa redução não foi inteiramente responsável pela diminuição da atividade da cadeia de transporte de elétrons.

Boushel *et al.* (2007) mensuraram a capacidade de fluxo de oxigênio ( $O_2$ ) mitocondrial nas fibras musculares de pacientes com DM2 e observaram que quando o fluxo de  $O_2$  é normalizado para o conteúdo de DNA mitocondrial ou atividade da citrato sintase, a capacidade de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa são semelhantes aos observados em indivíduos saudáveis da mesma idade. De acordo com esses autores os sinais celulares específicos que alteram o conteúdo mitocondrial, e assim, reduzem o transporte de elétrons (capacidade de fosforilação oxidativa) por unidade de massa muscular, contribuem para uma variedade de distúrbios de vias metabólicas, incluindo o acúmulo de gordura intracelular, resistência à insulina e intolerância à glicose.

No entanto, em análises no músculo esquelético de pacientes diabéticos, tanto *in vivo* como *ex vivo*, Phielix *et al.* (2008) mostraram que a respiração ADP-estimulada e a capacidade respiratória máxima estavam reduzidas em pacientes diabéticos em 35% e 31%, respectivamente, independente do teor mitocondrial alterado. Além disso, *in vivo*, observou-se uma redução da função mitocondrial em aproximadamente 25% nestes mesmos pacientes. Essa redução na atividade de transporte de elétrons mitocondrial é, em parte, atribuída ao conteúdo mitocondrial reduzido, mas o decréscimo na função mitocondrial é maior do que pode ser explicado pelo conteúdo mitocondrial apenas (KIM, WEI e SOWERS, 2008).

Alguns estudos sugerem ainda que a resistência à insulina relaciona-se com redução do conteúdo mitocondrial devido à baixa expressão de genes nucleares que regulam a biogênese mitocondrial, tais como co-ativador do receptor gama do peroxissoma ativado por proliferação 1 alfa e beta (PGC-1  $\alpha$  e PGC-1 $\beta$ ) (WU *et al.*, 1999; ST-PIERRE *et al.*, 2003). O PGC-1 $\alpha$  é considerado um regulador dominante da função, respiração e biogênese mitocondriais no músculo esquelético (WU *et al.*, 1999; VEGA *et al.*, 2000; KELLY e SCARPULLA, 2004). Sua expressão é aumentada pela demanda de ATP celular, incluindo o exercício físico, exposição ao frio e jejum (FINCK e KELLY, 2006, LEHMAN *et al.*, 2000; BAAR *et al.*, 2002). As duas proteínas quinases primárias envolvidas na regulação do PGC-1 $\alpha$  são a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (JAGER *et al.*, 2007) e a p38 (POGOZELSKI *et al.* 2009). Além disso, sua transcrição é influenciada pela interligação com outras vias. Por exemplo, o aumento do PGC-1 $\alpha$  induzido pelo aumento de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) citosólico é mediado pela proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII) (ROSE *et al.*, 2006; WRIGHT *et al.*, 2007).

O PGC-1 $\alpha$  é um co-ativador de diversos fatores de transcrição nucleares, incluindo o fator nuclear respiratório (NRF-1) e receptores ativados por proliferadores de peroxissoma  $\alpha$  e  $\beta$  (PPAR) (PUIGSERVER *et al.*, 1998; DUNCAN *et al.*, 2007; WU *et al.*, 1999). O NRF-1 regula a expressão de vários genes mitocondriais, incluindo os genes OXPHOS e o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), que são cruciais para a expressão gênica mitocondrial e replicação do genoma mitocondrial (WU *et al.*, 1999). Camundongos *knockouts* para o TFAM, por exemplo, exibem no músculo esquelético acúmulo de mitocôndrias anormais, e uma progressiva deterioração da função da cadeia respiratória (WREDENBERG *et al.*, 2002).

Estudos de microarranjos mostram que genes responsivos ao PGC-1 $\alpha$  são regulados negativamente em obesos caucasianos com intolerância à glicose e DM2 (MOOTHA *et al.*, 2003). Adicionalmente, já foi demonstrado que a ativação ou indução do PGC-1 $\alpha$  parece estar associada com melhora da função mitocondrial, bem como aumento da sensibilidade à insulina em animais e seres humanos (LAGOUGE *et al.*, 2006; MENSINK *et al.*, 2007).

Petersen *et al.* (2004), por exemplo, encontraram que indivíduos resistentes à insulina, descendentes de pacientes com DM2, apresentam uma redução de aproximadamente 30% da fosforilação mitocondrial quando comparados com indivíduos normais. Outro estudo demonstrou que resistentes à insulina descendentes de pacientes com DM2 não apresentaram redução da

expressão do mRNA ou do conteúdo protéico do PGC-1 $\alpha$ , mas tinham redução da densidade mitocondrial de 38% (MORINO *et al.*, 2006). Além disso, parentes normoglicêmicos de primeiro grau de pacientes com DM2 apresentaram no músculo esquelético níveis de mRNA do PGC-1 $\alpha$  comparáveis aos indivíduos controles (KARLSSON *et al.*, 2006).

No estudo de Patti *et al.* (2003) foi demonstrado que o músculo esquelético de pré-diabéticos e diabéticos é caracterizado pela redução da expressão de genes da fosforilação oxidativa, muitos dos quais regulados pelo NRF. Além disso, as expressões dos PGC-1  $\alpha$  e  $\beta$  foram significativamente menores em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos. Por outro lado, em outro estudo foi observado que a expressão do mRNA do PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$ , NRFs e TFAM não é diferente em resistentes à insulina descendentes de pais DM2 em comparação com o grupo controle, mas a função mitocondrial é reduzida significativamente (MORINO *et al.*, 2005).

Alterações na ação/expressão dos genes envolvidos com a biogênese mitocondrial podem levar a uma disfunção não apenas do número como também da atividade metabólica das mitocôndrias. Neste sentido, a infusão de lipídios ou a administração de uma dieta hiperlipídica para humanos saudáveis e roedores foram associadas com prejuízo da função mitocondrial, caracterizado por redução da síntese de ATP, do consumo de oxigênio e da fosforilação oxidativa (BREHM *et al.*, 2006; SPARKS *et al.*, 2005; CHANSEAUME *et al.*, 2006; SZENDROEDI *et al.*, 2009). Estes resultados foram corroborados por estudos *in vitro* em que células do músculo esquelético expostas ao ácido palmítico aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio, prejudicou a oxidação de ácidos graxos e diminuiu a expressão do PGC-1 $\alpha$  (DESCO *et al.*, 2002; ERDEI *et al.*, 2006; COLL *et al.*, 2006; PIMENTA *et al.*, 2008).

Essas alterações de conteúdo e/ou função mitocondrial estão diretamente associadas com prejuízo no metabolismo lipídico. O aumento da concentração de ácidos graxos circulantes e o acúmulo de gordura ectópica no músculo esquelético passam a ser deletério quando o maior fornecimento de lipídios para este tecido não é equilibrado por aumento do metabolismo oxidativo, de modo que os intermediários lipídicos, tais como ceramidas e diacilglicerol (DAG), se acumulam na célula e interferem com o sistema de sinalização da insulina (SCHMITZ-PEIFFER *et al.*, 1997; ITANI *et al.*, 2005). Neste contexto, Ragheb *et al.* (2009) avaliaram os efeitos dos AGL sobre a sensibilidade à insulina e vias de sinalização no músculo esquelético a

partir de cultura de células C2C12. Foi observado que a exposição aos ácidos graxos resultou em inibição na via de sinalização da insulina mediada pela ação de proteínas quinases.

Sabe-se que o DAG é um ativador alostérico das formas convencionais e novas da proteína quinase C (PKC). A ativação persistente de diferentes isoformas da PKC no músculo esquelético está associada à resistência a insulina (ITANI *et al.*, 2002; ITANI *et al.*, 2000; SCHMITZ-PEIFFER *et al.*, 1997). Yu *et al.* (2004), a partir de estudos *in vitro* e com animais, demonstraram que o aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos resultou em aumento das concentrações de acil-CoA e de DAG, desencadeando a ativação da PKC e consequente fosforilação inibitória do IRS-1 (Ser1101).

Assim como o DAG, estudos sugerem que as ceramidas e o ácido fosfatídico medeiam os efeitos deletérios do ácido palmítico sobre a fosforilação da Akt induzida pela insulina em cultura de miotubos (CHAVEZ *et al.*, 2005; CHAVEZ *et al.*, 2003). As ceramidas interferem com a sinalização da insulina por dois mecanismos distintos e ambos envolvem a translocação da Akt para a membrana plasmática. Em miotubos C2C12 as ceramidas interferem com a sinalização da insulina por meio do aumento da desfosforilação da Akt pelo PP2A, bloqueando assim a translocação da Akt para a membrana plasmática (CAZZOLLI *et al.*, 2001). Já em adipócitos humanos e de roedores, assim como em miotubos L6, as ceramidas inibem a translocação da Akt para a membrana plasmática por um mecanismo que envolve a PKC $\zeta$ . A PKC $\zeta$  ativada pela ceramidas promove a fosforilação do resíduo de treonina 34 da Akt (POWELL *et al.*, 2003; FOX *et al.*, 2007). Apesar destas diferenças, o ponto final comum é que as ceramidas interferem na cascata de sinalização da insulina via redução na ativação da Akt.

Esses estudos demonstram, em conjunto, que na obesidade o maior fluxo de ácidos graxos provenientes do tecido adiposo é associado com maior dificuldade do músculo esquelético em oxidar esses substratos. Esses fatores contribuem para o acúmulo de metabolitos lipídicos no tecido muscular, que podem inibir direta ou indiretamente componentes da via de sinalização da insulina.

### 2.3 Hsp72 e sensibilidade à insulina

As proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP) consistem em uma família de proteínas presentes em células eucarióticas e procarióticas que atuam em diversos processos celulares. As HSPs foram descritas em células de glândulas salivares de *Drosophila* expostas ao estresse térmico (TISSIÉRES, 1974). Como revisado por Kiang e Tsokos (1998), outros fatores, além do choque térmico, podem induzir a síntese dessas proteínas, como análogos de aminoácidos e glicose, metais pesados, estimuladores da PKC, agentes que elevam a concentração intracelular de cálcio, isquemia, infecções, óxido nítrico, hormônios e antibióticos. Essas proteínas são agrupadas em famílias de acordo com sua sequência de aminoácidos e com seu peso molecular. Em células de mamíferos, as HSPs mais induzidas em resposta ao estresse celular fazem parte da família de proteínas de 70 kD (HSP70), que inclui Hsp72, Hsp73, GRP78 e GRP75 (MEYER e SILVA, 1999).

A proteção celular mediada pelas HSP70 é, em parte, devida a capacidade das mesmas de funcionar como chaperonas moleculares, evitando a agregação inadequada de proteínas e, mediando o transporte de proteínas imaturas para as organelas de destino, para o empacotamento final, a degradação ou reparo (KIANG e TSOKOS, 1998). Adicionalmente essas proteínas são descritas por atuarem no controle da sinalização celular (CALDERWOOD *et al.*, 2007) e modulação da resposta imune (CHEN *et al.*, 2006). A HSP70 pode agir como molécula pró- e anti-inflamatória, alterando a produção e liberação de moduladores inflamatórios. Como efetor anti-inflamatório, o aumento intracelular de HSP70 modula a expressão de genes inflamatórios, pela inibição da translocação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) para o núcleo (SCHELL *et al.*, 2005). Como efetor pró-inflamatório, a liberação ativa (exossomos) ou passiva (ruptura da membrana celular) da HSP70 no meio extracelular induz uma resposta inflamatória envolvendo a ativação de uma variedade de células efetoras imunes e induzindo a liberação de citocinas (AMORIM e MOSELEY, 2010).

Hooper (1999) foi o primeiro a sugerir a participação da Hsp72 na modulação da sensibilidade à insulina. Nesse estudo, a temperatura corporal de pacientes com DM2 foi elevada (aumento médio de 0,8°C) por meio de imersão em água aquecida, durante 30 minutos, seis dias

por semana, durante três semanas, um processo similar à aclimação passiva ao calor, que eleva a expressão de Hsp72 em diversos tecidos corporais (YAMADA *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2010). Após a terapia com calor, os pacientes apresentaram melhora no controle glicêmico, evidenciada pela diminuição dos valores de hemoglobina glicosilada. O autor propôs que a melhora no controle glicêmico poderia estar relacionada com a maior expressão de Hsp72 no tecido muscular esquelético, embora medidas dessa proteína não tenham sido realizadas (HOOPER, 1999).

Outros autores (CHUNG *et al.*, 2008; GUPTE *et al.*, 2009) utilizaram modelos animais para investigar se a ativação da Hsp72 no músculo esquelético poderia reduzir o desenvolvimento da resistência à insulina. No estudo de Chung *et al.* (2008) a expressão da Hsp72 foi induzida no músculo esquelético de camundongos obesos resistentes à insulina. Os autores utilizaram diferentes meios para essa indução: exposição ao calor, indução farmacológica da Hsp72 (administração do derivado de hidroxilamina, BGP-15) ou superexpressão gênica da Hsp72. Todas as formas de induzir aumento na expressão de Hsp72 protegeram os camundongos contra a resistência à insulina. Resultado semelhante foi reportado por Gupta *et al.* (2009) que induziram a expressão da Hsp72 por meio do calor em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica. Após o tratamento com calor (imersão por 20 minutos até alcançar a temperatura de 41°C, uma vez por semana durante 12 semanas) observaram melhora da tolerância à glicose.

Chung *et al.* (2008) observaram ainda no músculo esquelético de indivíduos obesos resistentes a insulina, redução na expressão de Hsp72 e aumento de JNK fosforilada, em comparação com indivíduos eutróficos saudáveis. Dados de um estudo prévio do nosso grupo suportam esses achados (MATOS *et al.*, 2014). Observamos que indivíduos obesos resistentes à insulina no estado pós-prandial apresentam menor expressão intramuscular da Hsp70 e maior ativação intramuscular da JNK comparados a obesos e eutróficos sensíveis à insulina. Esses achados apontam para uma possível associação entre a ativação de sinalizadores intracelulares, sensibilidade à insulina e a Hsp72.

Henstridge *et al.* (2014), a partir de estudo realizado utilizando camundongos com superexpressão da Hsp72 no músculo esquelético, mostraram que a Hsp72 possivelmente atua na melhora da resistência à insulina ao promover aumento no número de mitocôndrias e do metabolismo oxidativo. Drew *et al.* (2014) reportaram que camundongos *knockout* para Hsp72

apresentam aumento da adiposidade e prejuízo na ação da insulina, ao passo que a regulação positiva dessa proteína pelo exercício crônico, superexpressão genética ou estimulação farmacológica protegem contra a obesidade e resistência à insulina. Demonstraram ainda que a Hsp72 tem um papel essencial na manutenção da morfologia das mitocôndrias.

Em conjunto, esses dados indicam a participação da Hsp72 nos mecanismos relacionados ao desenvolvimento da resistência à insulina induzida pela obesidade, e inclusive apontam para a possibilidade dessa proteína de ser um potencial alvo para diferentes intervenções terapêuticas.

## 2.4 Treinamento físico aeróbio e sensibilidade à insulina

Ao considerarmos os mecanismos relacionados à resistência à insulina induzida pela obesidade é fundamental considerarmos também as intervenções para o tratamento e/ou prevenção desse quadro. A resistência à insulina precede o DM2 por várias décadas e as complicações decorrentes do diabetes são frequentemente irreversíveis. Dessa forma, o ideal é atuar sobre o quadro de resistência à insulina antes do desenvolvimento do diabetes e de suas complicações secundárias. Nesse sentido, o exercício físico regular é uma das principais modalidades não farmacológicas empregadas no tratamento da obesidade e suas comorbidades.

O músculo esquelético é o principal contribuinte para as mudanças induzidas pelo exercício no metabolismo (GAITANOS *et al.*, 1993). Esse tecido apresenta grande capacidade de adaptação funcional e remodelação em resposta à atividade contrátil. Os mecanismos moleculares amplamente descritos que governam a adaptação ao exercício envolvem uma alteração gradual do teor de proteínas e da atividade enzimática (FLUCK e HOPPELER, 2003; COFFEY e HAWLEY, 2007). Estudos realizados tanto em humanos, quanto em animais demonstram que apenas uma sessão de exercício promove a fosforilação do IR estimulada pela insulina e também a associação dos IRS-1/2 com a PI3K (HOWLETT *et al.*, 2006; PAULI *et al.*, 2010; MATOS *et al.*, 2010). Em experimentos com modelo animal os efeitos de sensibilização à insulina após uma única sessão de exercício persistem entre 16 horas e 5 dias (REN *et al.*, 1994, CHIBALIN *et al.*, 2000).

Por outro lado, o treinamento físico resulta em um aumento persistente na ação da insulina no músculo esquelético de indivíduos obesos e resistentes à insulina. Evidências sugerem que a maior sensibilidade à insulina resultante do treinamento físico esteja relacionada a alterações na expressão e/ou atividade de proteínas envolvidas na tradução do sinal da insulina no músculo esquelético (HAWLEY e LESSARD, 2008). Frosig *et al.*, (2007), por exemplo, demonstraram que após 3 semanas de exercício físico houve aumento na atividade da PI3-K associada a IRS-1, aumento na fosforilação da AS160 e na expressão do GLUT4 no músculo esquelético de indivíduos saudáveis. No entanto, Christ-Roberts *et al.* (2004) observaram que 8 semanas de exercício físico aumentaram a sensibilidade à insulina em indivíduos diabéticos e não diabéticos, mas não alteraram a habilidade da insulina em estimular a atividade de PI3K associada a ativação de IRS-1. O’Gorman *et al.* (2006), também não observaram, após um programa de exercícios a curto prazo (7 dias), alteração na ativação de IRS1, IRS2, atividade da PIK3 e ativação de Akt e AS160 no músculo esquelético de indivíduos obesos diabéticos e não diabéticos. Contudo, reportaram aumento do conteúdo de GLUT4 e da sensibilidade à insulina em indivíduos obesos com diabetes.

O treinamento aeróbio também induz aumento do conteúdo mitocondrial e da capacidade oxidativa do músculo esquelético (HOLLOSZY, 1967). Schjerve *et al.* (2008) observaram que um programa de treinamento aeróbio de 12 semanas, em indivíduos obesos, foi efetivo em aumentar o conteúdo do PGC-1 $\alpha$ . Já foi reportado também que o treinamento aeróbio promove mudanças positivas na função mitocondrial e oxidação de lipídios em indivíduos obesos, como aumento do conteúdo muscular da CS, COX-II e COX-IV e da atividade enzimática da CS e da COX (DEVRIES *et al.*, 2013).

O treinamento físico pode ainda reduzir o estresse oxidativo. Konopka *et al.* (2015) reportaram que um programa de treinamento aeróbio de moderada intensidade aumentou a eficiência bioenergética e reduziu a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial (mtH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em mulheres obesas com resistência à insulina. Além disso, o treinamento aumentou a atividade antioxidante da catalase, que em conjunto com a menor produção de mtH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provavelmente explica a redução do dano oxidativo ao DNA do músculo esquelético. Observou-se também aumento da respiração mitocondrial e da atividade máxima de enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). De acordo com os autores, essas adaptações fisiológicas ao exercício são prováveis elementos-chave que contribuiram para a melhora na sensibilidade à insulina nessas mulheres.



Esses estudos demonstram, em conjunto, que o exercício físico regular é uma modalidade de tratamento da resistência à insulina induzida pela obesidade, com grande potencial terapêutico, uma vez que, atua simultaneamente em vários componentes moleculares que estão diretamente relacionados no controle da sensibilidade à insulina. Contudo, mesmo que sejam bem estabelecidos os benefícios do exercício físico, a maioria dos indivíduos não o pratica regularmente. Dentre as barreiras geralmente reportadas para a realização de um programa regular de exercícios físicos estão a falta de tempo, falta de acesso a instalações para exercícios e falta de motivação (SHERWOOD e JEFFERY, 2000; KORKIAKANGAS, ALAHUHTA, LAITINEN, 2009).

Considerando a falta de tempo como uma das principais barreiras da atualidade para a prática regular do exercício físico surgiu, nos últimos anos, entre indivíduos não atletas, um grande interesse no treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT). O HIIT trata-se de períodos de exercício intenso alternados com períodos de recuperação ativa ou passiva (HELGERUD *et al.*, 2007). Constitui uma estratégia de treinamento relativamente eficiente em termos de tempo para aumentar rapidamente a capacidade energética oxidativa e provocar remodelação fisiológica que se assemelha às mudanças normalmente promovidas pelo treinamento aeróbico contínuo de moderada intensidade (GIBALA, GILLEN e PERCIVAL, 2014). Sawyer *et al.*, (2016), por exemplo, submeteram adultos obesos à 8 semanas de HIIT ou treinamento contínuo de moderada intensidade. Ambos os protocolos promoveram aumento do consumo máximo de oxigênio, sendo que o HIIT requereu 27,5% menos tempo total de exercício.

O treinamento intervalado foi inicialmente descrito na década de 50 (REINDELL e ROSKAMM, 1959). Nessa época era uma modalidade de treinamento utilizada principalmente por atletas. Na década de 60, surgiram os primeiros estudos científicos sobre o treinamento intervalado. Naquele período foi proposto o treinamento intervalado de alta intensidade e curta duração em uma intensidade correspondente a 100% do consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ), onde 10 segundos de corrida eram alternados com 10 segundos de repouso (CHRISTENSEN *et al.*, 1960). Há ainda relatos da utilização do treinamento intervalado na reabilitação cardíaca, quando os pacientes realizavam exercícios em cicloergômetro em altas cargas de trabalho por 60 segundos com 30 segundos de descanso entre os intervalos. Usando o exercício intervalado, os pacientes foram capazes de se exercitar por pelo menos o dobro do

tempo que eles foram capazes de fazer quando se exercitava continuamente (SMODLAKA, 1972).

Segundo Gibala e Jones (2013) os indivíduos preferem realizar sessões de HIIT a longas séries de exercícios de baixa intensidade. O HIIT, ao contrário do treinamento contínuo tradicional, permite uma variedade de ajustes no número, duração e intensidade de cada uma das séries de trabalho (estímulos), juntamente com a duração e a intensidade dos intervalos de recuperação. Isso pode permitir que o interesse seja mantido a longo prazo. Em indivíduos destreinados ou ativos recreativamente, o HIIT é uma estratégia eficiente em termos de tempo para melhorar rapidamente a capacidade ao exercício e estimular inúmeras adaptações fisiológicas (STUTTS *et al.*, 2002; GIBALA *et al.*, 2006; BURGOMASTER *et al.*, 2008). Além disso, períodos de trabalho de curta duração em maior intensidade, resultam em redução na resposta ventilatória e resultante dispnéia, que em muitos pacientes com doenças crônicas são fatores limitantes para o exercício contínuo (BEAUCHAMP *et al.*, 2010).

Historicamente atletas e treinadores têm usado o HIIT para melhora do desempenho esportivo, contudo, a eficácia do HIIT em promover benefícios relacionados à saúde gerou um novo interesse (KESSLER, SISSON e SHORT, 2012). Em recentes revisões, existe um consenso sobre benefícios do HIIT na população geral (KESSLER, SISSON e SHORT, 2012; GUIRAUD *et al.*, 2012., HWANG, WU e CHOU, 2011., WESTON, WISLØFF e COOMBES, 2014). O estudo realizado por Gibala *et al.* (2007) foi um dos primeiros a comparar diretamente as adaptações no músculo esquelético após o treino intervalado em relação ao treinamento contínuo de intensidade moderada. Os autores reportaram aumento da atividade de componentes mitocondriais após 6 sessões de treinamento, como da citrato sintase e da citocromo c oxidase. Houve um dispêndio de 2,5 horas no treino intervalado e 10,5 horas no treinamento contínuo. Além disso, o volume total de treinamento baseado no trabalho mecânico foi aproximadamente 90% menor no grupo intervalado (~ 630 *versus* ~ 6.500 kJ).

Estudos adotando diferentes protocolos de treinamento intervalado e realizados com diferentes populações demonstram aumento significativo da capacidade cardiorrespiratória (MA *et al.*, 2013; ASTORINO *et al.*, 2012). Revisões sistemáticas e meta-análises realizadas recentemente reforçam esses achados (GIST *et al.*, 2013; SLOTH *et al.*, 2013). Sloth *et al.* (2013) realizaram uma meta-análise com 19 estudos e reportaram aumento do VO<sub>2</sub>máx de 4-13%

após 2 a 8 semanas de treinamento intervalado em sedentários saudáveis ou ativos recreativamente.

Adicionalmente, os estudos têm demonstrado o potencial efeito do treinamento intervalado sobre fatores de risco cardiometabólicos. Hood *et al.* (2011) examinaram o efeito de um protocolo de HIIT (10×60 segundos 80-95% da frequência cardíaca reserva, 60 segundos recuperação) durante 2 semanas e encontraram aumento da sensibilidade à insulina. No estudo de Gillen *et al.* (2013) um protocolo de 6 semanas (10 x 60segundos (s) ~90% da frequência cardíaca máxima (FC máx), 60 segundos recuperação) melhorou a composição corporal e a capacidade oxidativa muscular em mulheres com sobrepeso e obesidade. Em outro trabalho foi observado que um protocolo de 12 semanas (6-10×60s ~75-95% da FC máx, 75s recuperação) promoveu melhora da oxidação de gordura em mulheres com sobrepeso, sedentárias, mas não alterou o peso ou composição corporal (ASTORINO *et al.*, 2013).

De modo geral, os estudos demonstram um potencial da aplicação do HIIT para indivíduos obesos, com a grande vantagem de promover adaptações semelhantes ao treinamento aeróbio contínuo, mas de maneira tempo-eficiente. O HIIT apresenta-se, dessa forma, como uma modalidade de treinamento interessante para se investigar os mecanismos pelos quais o treinamento físico pode melhorar a sensibilidade à insulina em indivíduos obesos.

### 3 JUSTIFICATIVA

A obesidade é um agravo de saúde para as sociedades modernas pela sua incidência crescente e por estar associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como DM2 e doenças cardiovasculares (OPAS, 2003). Estima-se que os gastos públicos mundiais com a obesidade podem chegar a 9,1% (TSAI *et al.*, 2011). No Brasil, o custo direto do SUS com o adulto obeso em 2011 foi de US\$ 269.6 milhões (BRASIL, 2011).

A obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do DM2. Ao considerarmos a história natural do DM2, sugere-se que o excesso de peso leva a resistência à insulina, inicialmente compensada pela hipersecreção desse hormônio, mas com valores normais de glicemia. A resposta compensatória de secreção pelo pâncreas começa a reduzir progressivamente, resultando em prejuízo da tolerância à glicose e por fim no DM2, fase final e irreversível desse processo, que é acompanhada de diversas complicações a longo prazo (SCHENK *et al.*, 2008; STUMVOLL *et al.*, 2005). Phillips *et al.* (2014) publicaram um estudo de revisão que aponta a possibilidade de mudanças nessa história natural através de exames de rotina para identificar precocemente o pré-diabetes e diabetes, aliada a uma gestão destinada a manter as concentrações de glicose o mais próximo possível do normal a partir de mudanças no estilo de vida.

Neste contexto, o exercício físico regular é um importante aliado na prevenção e tratamento da obesidade e resistência à insulina. Mais recentemente, o HIIT foi proposto como uma eficaz alternativa capaz de promover adaptações fisiológicas positivas e consequentemente importantes para a melhoria de indicadores de saúde de indivíduos aparentemente saudáveis e de diversas populações com patologias específicas. Tornando-se dessa forma, uma modalidade de exercício interessante para investigar os efeitos do treinamento físico sobre componentes moleculares e celulares relacionados à resistência à insulina em indivíduos obesos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Avaliar os efeitos de um programa de treinamento intervalado de alta intensidade em componentes celulares e moleculares relacionados à resistência à insulina em indivíduos obesos.

### 4.2 Específicos

Avaliar em indivíduos obesos sensíveis e resistentes à insulina o efeito do treinamento intervalado de alta intensidade em:

1. Parâmetros bioquímicos séricos.
2. Composição corporal.
3. Citocinas circulantes.
4. Estado redox sistêmico.
5. Frequência das subpopulações de leucócitos periféricos.
6. Fosforilação/conteúdo de proteínas da via de sinalização da insulina, via das MAPKs e proteínas mitocondriais no músculo esquelético.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Delineamento experimental**

Este estudo trata-se de um ensaio clínico não randomizado, onde as variáveis de interesse foram comparadas antes e após um programa de treinamento intervalado de alta intensidade em indivíduos obesos sensíveis ou resistentes à insulina. A coleta de dados e as análises das amostras foram executadas nos Laboratórios de Fisiologia do Exercício (LAFIEX) e Biologia do Exercício (BIOEX) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Diamantina, Minas Gerais), Santa Casa de Caridade de Diamantina e no Centro Especializado em Reabilitação (CER-IV).

### **5.2 Cuidados éticos**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (protocolo 054/10) (ANEXO A). Ao apresentarem-se como voluntários, os indivíduos foram informados sobre os objetivos e procedimentos metodológicos do estudo, bem quanto aos possíveis riscos, desconfortos e benefícios relacionados à participação na pesquisa. A participação no estudo como voluntário foi condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

### **5.3 Amostra**

Os voluntários desse estudo foram recrutados a partir de listas fornecidas pelas unidades de Estratégia de Saúde da Família, distribuição de folders em unidades de saúde, na UFVJM, nos hospitais e por meio de cartazes e anúncios distribuídos em pontos comerciais do município de

Diamantina. Foram incluídos indivíduos com idade entre 18 e 60 anos, não fumantes, não praticantes de atividade física regular, que apresentavam massa corporal estável e que não havia participado de programas de redução de peso nos últimos 6 meses. Além disso, não faziam o uso de medicamentos anti-inflamatórios, hipoglicemiantes ou outros conhecidos por afetar o metabolismo. Não reportaram a presença de doenças agudas ou crônicas como cardiovasculares, cerebrovasculares, hepáticas, renal, hematológica, respiratória, tireoidianas, neoplásicas, inflamatórias e imunológicas e sem histórico prévio de desmaio durante a prática de exercícios e/ou procedimento de coleta de sangue.

Foram selecionados indivíduos, de ambos os sexos, classificados como obesos e posteriormente, indivíduos eutróficos para o grupo controle que não foram submetidos ao programa de treinamento. O voluntário foi classificado como obeso ou eutrófico, de acordo com o IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> ou entre 18,5 e 24,9 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente (OMS, 1998).

Inicialmente, foram recrutados 70 indivíduos obesos. Após a triagem inicial foram excluídos 28 indivíduos. Posteriormente, os 42 voluntários enquadrados nos critérios de inclusão foram submetidos à realização de exames de glicemia e ao teste de tolerância oral à glicose (TTOG). Após essa etapa foram excluídos 9 voluntários por apresentarem glicose de jejum alterada (valores superiores a 100mg/dl) ou intolerância à glicose (valores superiores a 140mg/dl), e os mesmos foram encaminhados para avaliação médica.

Trinta e três voluntários obesos foram selecionados e alocados em 2 grupos de acordo com presença ou não de resistência à insulina, definida pelo HOMA-IR  $\geq 2,71$ . Ao final do estudo utilizamos para as análises 18 indivíduos obesos, 9 em cada grupo, que completaram o programa de treinamento. Os indivíduos eutróficos recrutados para o estudo não apresentavam resistência à insulina e foram pareados de acordo com a idade e gênero aos voluntários obesos. Dessa forma, de acordo com a classificação do IMC e presença ou não de resistência à insulina cada voluntário foi alocado em um dos três grupos experimentais conforme a figura 2.

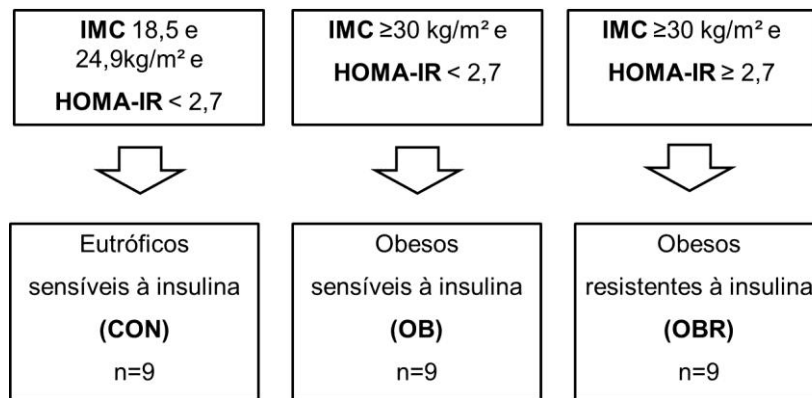


Figura 2- Grupos experimentais de acordo com o IMC e presença ou não de resistência à insulina.

Em todos os voluntários foram avaliadas variáveis bioquímicas, antropométricas e de condicionamento físico. Analisou-se a concentração de citocinas circulantes, estado redox sistêmico, frequência de leucócitos periféricos e proteínas no músculo esquelético. Foi realizada também a análise da ingestão alimentar dos voluntários durante o período de estudo. Para os indivíduos obesos as avaliações foram feitas antes de iniciar o treinamento (pré-treino) e após treinamento (pós-treino). Todos os procedimentos estão descritos a seguir.

#### 5.4 Análises bioquímicas

Os voluntários foram orientados a permanecerem em jejum durante as 12 horas que antecederam os exames. Todas as análises bioquímicas foram realizadas por um laboratório de análises clínicas de acordo com as técnicas por ele adotadas. Foram realizadas medidas da glicose, insulina, colesterol total e frações (LDL, HDL e VLDL) e triglicérides. Essas análises foram repetidas para os indivíduos obesos 72 horas após a última sessão de treinamento.

A partir dos valores de glicemia e insulinemia de jejum foi estimada a resistência à insulina e função secretora das células beta pancreáticas pelo HOMA (MATTHEWS *et al.*, 1985). O índice de resistência à insulina (HOMA1-IR) foi calculado a partir da seguinte equação:



Equação 1.  $\text{HOMA1-IR} = \text{glicemia (mmol)} \times \text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \div 22,5.$

A resistência à insulina foi definida por um índice HOMA1-IR maior que 2,71. De acordo com Geloneze *et al.*, (2006), esse ponto de corte possui aplicação clínica e epidemiológica na identificação de resistência à insulina em populações miscigenadas multiétnicas ocidentalizadas. Já a função secretora das células beta pancreáticas (HOMA- $\beta$ ) foi estimada a partir da seguinte equação:

Equação 2.  $\text{HOMA-beta} = 20 \times \text{Insulina } (\mu\text{U/ml}) \div (\text{Glicemia (mmol)} - 3,5).$

Os voluntários foram submetidos ainda ao TTOG. Após a coleta de sangue em jejum, o voluntário ingeriu 75 g de dextrose e realizaram-se coletas de sangue a cada 30 minutos durante as 2 horas subsequentes para determinação das concentrações de glicose e insulina. Obteve-se os valores de glicemia e insulinemia em 5 momentos: 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, a partir dos quais foi traçado uma curva e calculada a área sob a curva (AUC) para insulina e glicose. Para isso foi aplicado o método trapezoidal, utilizando o programa GraphPad Prism, versão 6 (GraphPad Software, Inc., USA).

A partir do TTOG foi também calculado o índice de sensibilidade muscular à insulina (ISMI). O cálculo desse índice baseia-se no fato de que o aumento da concentração de glicose no plasma durante o TTOG estimula a captação de glicose pelos tecidos periféricos, principalmente pelo músculo esquelético. Como não há nenhuma alteração significativa na taxa de produção de glicose endógena durante o período de tempo do TTOG de 60 a 120 minutos, a diminuição na concentração de glicose no plasma após 60 minutos reflete principalmente a captação de glicose por tecidos periféricos, como o músculo esquelético. Dessa forma, o declínio da concentração de glicose no plasma a partir do seu pico durante o TTOG é determinada pela combinação da resistência à insulina no músculo esquelético e a concentração de insulina no plasma. Dessa forma, a sensibilidade à insulina no músculo esquelético pode ser calculada como a taxa de declínio na concentração de glicose plasmática a partir do seu valor de pico (DG/DT), dividida

pela concentração de insulina no plasma (I) (ABDUL-GHANI *et al.*, 2007):

$$\text{Equação 3.} \quad \text{ISMI} = \text{DG/DT} \div \text{I}$$

O DG representa o delta do valor do pico da glicose ao seu menor valor e o DT representa o delta do tempo em que esse decaimento da glicose ocorreu (ABDUL-GHANI *et al.*, 2007). De acordo com esses autores, o índice proposto apresenta alta correlação com a *clamp* euglicêmica.

### 5.5 Avaliação antropométrica e da composição corporal

Os voluntários foram classificados quanto ao seu estado nutricional a partir do IMC (OMS, 1998), calculado através da divisão da massa corporal (kg) pelo quadrado da estatura (m). Para o cálculo, foram mensuradas estatura e massa corporal, usando uma balança analógica (Welmy, modelo 110, precisão de 0.1 kg) com estadiômetro acoplado (precisão de 0,5 cm).

Realizou-se também a medida da circunferência da cintura. Para isso, os voluntários foram instruídos a ficar em pé, abdômen relaxado, braços estendidos ao longo do corpo e pés separados numa distância de 25 a 30 cm. A fita métrica foi passada, niveladamente, ao redor da cintura no ponto localizado entre a última costela e as cristas ilíacas, região que ficou despida durante a mensuração (SISVAN, 2004).

Para avaliação da composição corporal foi utilizada a absorptometria radiológica de dupla energia (DEXA) (Lunar, DPX, Madison, Wisconsin, USA). Os voluntários foram posicionados na área de escaneamento do equipamento, de modo que a linha sagital demarcada nessa área passasse sob o centro de alguns pontos anatômicos como o crânio, a coluna vertebral, a pélvis e as pernas. Os indivíduos foram avaliados trajando roupas leves, sem o uso de qualquer objeto de metal que pudesse interferir nas medidas. A partir dessa análise obteve-se o percentual de gordura corporal total, as quantidades de massa gorda, massa magra e de tecido adiposo visceral.

## 5.6 Avaliação do condicionamento físico

Realizou-se um teste de esforço físico progressivo máximo em bicicleta ergométrica (Corival, Medgraphics, EUA) utilizando-se o protocolo de rampa (MYERS e BELLIN, 2000). Os voluntários receberam as seguintes orientações pré-teste: comparecer com vestimenta adequada para a realização do exercício, realizar uma refeição leve e ingerir 500 mL de água no mínimo duas horas antes do teste, não ingerir bebidas com cafeína ou álcool 24 horas antes do teste, dormir no mínimo 8 horas na noite anterior ao teste e evitar realizar atividades extenuantes e de longa duração (ACSM, 2006).

Inicialmente, para estimar a potência máxima do protocolo de rampa, o *Veterans Specific Activity Questionnaire* (VSAQ) (ANEXO B) foi aplicado para cada voluntário. Esse questionário apresenta uma lista de atividades com aumento progressivo de intensidade em termos de equivalentes metabólicos (METs). Os voluntários foram instruídos a determinar no questionário a primeira atividade que poderia causar fadiga ou dispnéia que levaria à interrupção do exercício após 5 a 10 minutos.

A partir dos METs derivados do VSAQ e da idade do voluntário foi utilizado um nomograma (MYERS *et al.*, 1994) para determinar a capacidade máxima de trabalho de cada voluntário:

$$\text{Equação 4.} \quad \text{METs} = 4,7 + 0,97 (\text{VSAQ}) - 0,06 (\text{idade}).$$

Posteriormente, foi predita a capacidade máxima para o exercício a partir da equação (MYERS, 1996):

$$\text{Equação 5.} \quad \text{Capacidade de trabalho (watts): } (\text{METs}_{\text{nomogram}} - 1) \times \text{peso corporal (kilograms)} / 3.486.$$

A partir do dado da capacidade de trabalho (watts), foi elaborado o protocolo para o teste de esforço máximo, no qual foram feitos incrementos de carga a cada 1 minuto, de tal forma que a fadiga ocorresse entre o oitavo e décimo segundo minutos. Durante o teste, a cada minuto, foram monitoradas e registradas a frequência cardíaca, pressão arterial e a percepção subjetiva de esforço (PSE, BORG, 1998). Além disso, o traçado eletrocardiográfico foi monitorado por um cardiologista. O teste foi considerado máximo quando os seguintes parâmetros foram atingidos: PSE superior a 18, frequência cardíaca maior que 90 % da máxima prevista pela idade ( $FC_{\max} = 220 - \text{idade}$ ) e fadiga (POOLE *et al.*, 2008).

A partir desse teste obteve-se a potência máxima (watts), definida como a potência desenvolvida no último estágio completo do protocolo e o consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2\max}$ ) calculado pela seguinte equação (ACSM, 2006):

$$\text{Equação 6. } VO_2 (\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) = 1,8 \times (\text{trabalho}) / (\text{massa corporal}) + 3,5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} + 3,5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}.$$

## 5.7 Protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade

O programa de treinamento consistiu em 8 semanas de exercício intervalado de alta intensidade utilizando-se bicicletas ergométricas. Antes de iniciar e finalizar a sessão de exercício, o voluntário pedalava durante 2 minutos mantendo uma potência de 30 w. Cada período de exercício de alta intensidade (estímulo) teve uma duração de 60 segundos, intercalado por períodos de recuperação ativa nos quais o voluntário pedalava mantendo uma potencia de 30 w por 60 segundos. A intensidade e o volume do exercício foram aumentados progressivamente durante o período de treinamento (8 a 12 estímulos; 80 a 110% da potência máxima do teste ergométrico) (TABELA 1). O treinamento foi realizado 3 vezes por semana. Durante todas as sessões a frequência cardíaca dos voluntários foi monitorada, sendo registrada ao final de cada minuto de exercício. Ao final da quarta semana foi novamente realizado o teste de esforço para

reajuste da intensidade do exercício. Para ser incluído nas análises, o voluntário deveria ter uma adesão mínima de 85% nas sessões de treinamento.

Tabela 1 - Protocolo do treinamento intervalado de alta intensidade

<b>Semanas</b>	<b>Intensidade (% potência máxima)</b>	<b>Número de estímulos</b>	<b>Duração estímulo (seg)</b>	<b>Potência na recuperação (w)</b>	<b>Duração recuperação (seg)</b>	<b>Duração da sessão (min)</b>
<b>1</b>	80%	8	60	30	60	16
<b>2</b>	85%	8	60	30	60	16
<b>3</b>	90%	9	60	30	60	18
<b>4</b>	100%	9	60	30	60	18
<b>5</b>	100%	9	60	30	60	18
<b>6</b>	100%	10	60	30	60	20
<b>7</b>	110%	11	60	30	60	22
<b>8</b>	110%	12	60	30	60	24

## 5.8 Registro alimentar

Os voluntários foram orientados a não modificarem os hábitos alimentares durante o período do estudo. Para acompanhamento da ingestão alimentar (composição de macronutrientes e calorias) foi utilizado o registro alimentar de 3 dias de uma mesma semana, sendo estes alternados, correspondentes a um dia de final de semana e dois dias ao longo da semana, conforme sugerido por Willet e Stampfer (1986). Para melhor estimativa do tamanho das porções, os voluntários foram orientados a efetuar o registro dos alimentos ingeridos nesses 3 dias em medidas caseiras tradicionalmente usadas. Os registros foram realizados antes das avaliações iniciais, e antes das avaliações finais.

Os dados obtidos pelos registros foram convertidos em peso (kg) ou volume (mL) e analisados com o auxílio do software DietPro<sup>®</sup>, versão 5.7 (A.S. Sistemas, 2013). Valores médios

de energia (Kcal) e de macronutrientes (proteínas, lipídeos e carboidratos) foram mensurados, e quantificados em calorias, gramas e percentual calórico da dieta.

## 5.9 Coleta e análise das amostras

### 5.9.1 Coleta

#### Amostras de sangue

Amostras de sangue foram coletadas em dois momentos: antes do início do treinamento e 72 horas após a última sessão de exercício, estando o voluntário em jejum de 12 horas. Aproximadamente 30 mL de sangue foram coletados por punção na veia antecubital e distribuídos em tubos contendo EDTA ou com ativador de coagulação. Parte do sangue coletado em EDTA foi utilizada para marcação fenotípica e contagem dos leucócitos.

O sangue foi centrifugado (200 xg por 10 minutos) imediatamente após a coleta e o plasma e/ou soro estocados a - 80°C até as análises. A partir do soro foi determinada a concentração das citocinas e a partir do plasma avaliado o estado oxidativo.

#### Tecido muscular

A biópsia do músculo vasto lateral foi realizada na perna dominante do voluntário, após jejum de 12 horas, e executada por um médico cirurgião. A coleta de tecido muscular foi realizada em dois momentos do estudo, antes do início do programa de treinamento físico e 72 horas após a última sessão de exercício como descrito por outros estudos (LITTLE *et al.*, 2010; HOOD *et al.*, 2011). A segunda biópsia foi realizada a uma distância de aproximadamente 5 cm da primeira. Para a realização desse procedimento os voluntários ficaram na posição supina em uma maca e a assepsia da pele no local da biópsia foi realizada com uma solução tópica anti-séptica. Um campo cirúrgico incisional estéril foi fixado ao redor do local da incisão. Em seguida, a pele e o tecido adiposo foram anestesiados com 6 a 7 mL de uma solução de xilocaína

2% com epinefrina. Uma incisão de aproximadamente 0,75cm foi realizada na pele do voluntário utilizando um bisturi para incisões delicadas (número 11). Uma agulha específica para biópsia muscular (DL MICOF, Brasil) foi inserida na incisão e, após a sucção promovida por uma pressão, criada por uma seringa descartável de 60 mL acoplada a um equipo, uma amostra de aproximadamente 100 mg de tecido muscular esquelético foi coletada. A amostra foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada na sequência em ultrafreezer (-80°C). Após a biópsia, pressão manual com gaze estéril foi aplicada ao local e a pele coberta com fita cirúrgica (FIGURA 3). A partir dessas amostras foram analisadas o conteúdo e a fosforilação de proteínas pela técnica de western blot.

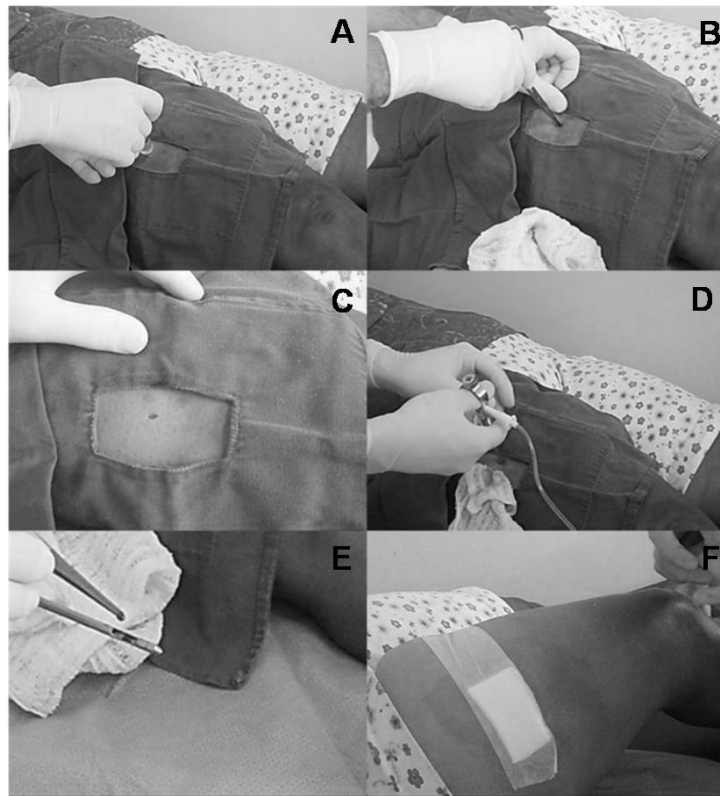


Figura 3- Procedimento de biópsia do músculo vasto lateral. **A**- anestesia. **B** e **C** incisão. **D**- inserção da agulha de biópsia. **E**- amostra de tecido coletada. **F**- curativo no local da incisão.

### 5.9.2 Análise das citocinas circulantes

A análise da concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no soro foi realizada pela técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) por meio de kits de alta sensibilidade (Quantikine®HS, R&D Systems Minneapolis), segundo as instruções do fabricante. Os limites inferiores de detecção dos ensaios de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram 0,106, 0,039 e 0,03pg/mL, respectivamente.

### 5.9.3 Análise dos parâmetros do estado redox

O estado redox foi avaliado a partir da medida da concentração de marcadores de estresse oxidativo e da atividade de enzimas antioxidantes. Nós avaliamos a ocorrência de peroxidação lipídica a partir da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tanto no plasma quanto nos eritrócitos. Avaliamos também a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nos eritrócitos e, por fim, no plasma a capacidade antioxidante total plasmática pelo método de redução do ferro (FRAP - “Ferric reducing ability of plasma”).

#### 5.9.3.1 Análise dos parâmetros do estado redox eritrocitário

Para a lise dos eritrócitos, utilizou-se o método descrito por Glass e Gershon (1981). Assim, foram adicionados a 300  $\mu$ L de eritrócitos, 1,5 vezes desse volume (450  $\mu$ L) de tampão fosfato de potássio (5 mM, pH 7,0) e essa suspensão passou por um processo de congelamento e descongelamento por 3 vezes. Na sequência a suspensão foi centrifugada a 12.000 xg, por 30 minutos. Após a centrifugação foram reservados 340  $\mu$ L do sobrenadante do lisado e a este foram adicionados 425  $\mu$ L (1,25 vezes o volume de sobrenadante) de clorofórmio e etanol gelados e 600  $\mu$ L (2 vezes o volume do sobrenadante) de tampão fosfato de potássio (5 mM, pH 7,0). Essa mistura foi centrifugada a 12.000 xg, por 30 minutos. O sobrenadante do lisado eritrocitário foi separado em alíquotas e congelado a -80°C, sendo descongelado apenas uma única vez para a



análise de peroxidação lipídica e para a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, conforme descrito nas próximas sessões.

#### 5.9.3.1.2 Análise da peroxidação lipídica no lisado eritrocitário

A reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído, principal produto da peroxidação lipídica, foi utilizada para determinar a concentração de TBARS, descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), e modificado segundo Uchiyama e Mihara (1978). Alíquotas do lisado eritrocitário (0,35 mL) foram adicionadas a 0,25 mL de ácido acético (2,5M; pH 3,4), 0,25 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8% (SIGMA, EUA) e 0,15 mL de água Miliq. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida a 90°C durante 90 minutos. Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 5.000 xg (Thermo Electron Led GMBH D37520, Alemanha) e 0,250 mL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços de fundo chato. Na sequência, a leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (SpectraMax®190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), a 532 nm. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de malondialdeído (MDA) (1,1,3,3-tetrametoxipropano) (Sigma, EUA) foi construída e submetida às mesmas condições da amostra para estimativa da concentração de TBARS nas amostras analisadas, expressa em nmol MDA/mg/proteína. As medidas foram realizadas em duplicata.

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Amostra de albumina de soro bovino (BSA) (1mg/mL) foi utilizada como padrão. A leitura, em triplicata, foi realizada em leitor de microplacas (SpectranMax®190, Molecular Devices, EUA) e os valores de proteína determinados pelo software Softmaxpro® (V5.4, Molecular Devices, EUA) em mg/mL.

#### 5.9.3.1.3 Determinação da atividade da superóxido dismutase

O ensaio para determinar a atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi realizado de acordo com Maklund e Maklund (1974), com algumas modificações. O lisado eritrocitário (0,13 mL) foi

adicionado a 0,87 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM pH 8.2, 37°C) contendo 1mM de ácido dietilenotriaminapentaacético (DTPA) (Sigma, EUA) e homogeneizado. Iniciou-se a reação por adição de 0,2 mM de pirogalol (1,2,3-benzenotriol) (Sigma, USA) e a reação foi determinada em leitor de microplacas a 420 nm, a 37°C, durante 250 segundos. O resultado da atividade da SOD foi expresso em unidades por miligrama de proteína (U/mg prot.), onde uma unidade de enzima é a quantidade de enzima que causa a inibição da auto-oxidação do pirogalol em 50%. As medidas foram realizadas em duplicata.

#### 5.9.3.1.4 Determinação da atividade da catalase

A medida da atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi realizada de acordo com o método descrito por Nelson e Kiesow (1972), com algumas modificações. Foram adicionados a 1,4 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0, 25°C), 0,015 mL de lisado eritrocitário e 0,055 mL de solução de peróxido de hidrogênio (Sigma, EUA) a 0,3M. A reação de decomposição do peróxido de hidrogênio foi acompanhada durante 1 minuto, a 25°C, espectofotometricamente, a 240 nm (Double beam spectrophotometer visible UV, CE-Libra S22, Faotuo). A atividade da catalase foi expressa em milimolar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto por minuto por miligrama de proteína ( $\Delta E/\text{min}/\text{mg prot.}$ ). As medidas foram realizadas em duplicata.

#### 5.9.3.2 Análise dos parâmetros do estado redox plasmático

##### 5.9.3.2.1 Análise da peroxidação lipídica plasmática

Para análise da peroxidação lipídica no lisado eritrocitário, utilizou-se o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi, (1979). Aliquotas de plasma (0,4 mL) foram adicionadas em 1000  $\mu\text{L}$  de ácido acético 2,5M (pH 3,4) e a 250  $\mu\text{L}$  ácido tiobarbitúrico 0,8%. Esta mistura foi incubada por 90 minutos a 95 °C. Após resfriamento foram acrescidos 2,2 mL de n-butanol e a mistura foi homogeneizada no vórtex por 30 segundos e depois centrifugada a 1400 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e analisado conforme descrito anteriormente.

### 5.9.3.3 Medida da capacidade antioxidante total plasmática

O ensaio da capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP) foi realizado de acordo com Benzie e Strain (1996). A capacidade de redução do complexo da forma férrica  $\text{Fe}^{3+}$  - ferri-tripiridiltriazina (TPTZ) para a forma  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ dos antioxidantes plasmáticos, em pH ácido, determina o poder antioxidante.

Para a confecção do reagente FRAP, 25 mL de tampão acetato de sódio (0,3 M, pH 3,6) foram acrescentados a 2,5 mL de TPTZ (10 mM) e depois misturado a 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20 mM). A uma alíquota de 528  $\mu\text{L}$  do reagente FRAP foi adicionado 72  $\mu\text{L}$  de plasma. Essa mistura foi homogeneizada e incubada no escuro, a 37 °C por 30 minutos. Depois de encubadas, as amostras foram centrifugadas a 300 xg por 5 min, e o sobrenadante foi analisado, em duplicata, em leitor de microplacas, a 593 nm. A capacidade antioxidante total do plasma foi expressa em equivalentes de  $\text{Fe}^{2+}$ , determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de  $\text{FeSO}_4$  e normalizada pela quantidade de proteína na amostra. Os resultados foram expressos como mg  $\text{FeSO}_4$ /mg de proteína. As medidas foram realizadas em duplicata.

### 5.9.4 Contagem leucocitária do sangue periférico

A contagem total dos leucócitos foi realizada manualmente por meio do método de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das diferentes populações leucocitárias foi realizada pela observação em microscópio óptico do esfregaço sanguíneo, após coloração com Geimsa e May-Grunwald, conforme descrito por Vallada (1999).

### 5.9.5 Análise do fenótipo de leucócitos do sangue periférico

O fenótipo de linfócitos e monócitos do sangue periférico foi determinado por marcação de antígenos de superfície específicos, por citometria de fluxo, utilizando sangue total. Para isso, aproximadamente 50 µL de sangue periférico foram incubados por 30 minutos, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, com anticorpos monoclonais (TABELA 2), dirigidos contra moléculas expressas na superfície de leucócitos, conjugados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrinacianina-5 (PECy5) ou proteína clorofila peridina (PerCP). Como controle de isotipo, uma amostra de sangue foi incubada por igual período com imunoglobulinas de rato anti-camundongo dos mesmos isotipos dos anticorpos utilizados. Após a incubação, foi realizada uma lavagem (7 minutos, 200xg) com 1 mL de tampão fosfato salina (PBS 0,015 M pH 7,4).

Tabela 2- Relação dos anticorpos utilizados nos experimentos de citometria de fluxo.

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b># catálogo*</b>
anti-CD14	PerCP	MφP9	340585
anti-CD3	PECy5	HIT3a	555341
anti-CD56	PE	B159	555516
anti-CD16	FITC	3G8	560996
anti-CD8	PECy5	MOPC-21	560662
anti-CD4	PE	RPA-T4	555347

\*BD Biosciences

Em seguida, para lise das hemácias foi adicionado 1 mL de solução de lise eritrocitária às amostras e estas foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Na sequência as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS (PBS 0,015 M pH 7,4) por centrifugação a 200xg, 7 min, 4°C. O precipitado de leucócitos foi então suspenso em 150µL de PBS e fixado pela adição de 150µL de paraformaldeído 2%. As amostras foram mantidas a 4° C por até 48

horas para posterior leitura em citômetro de fluxo, utilizando o FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) com aquisição de pelo menos 30.000 eventos na região de linfócitos e 100.000 na de monócitos. Os dados adquiridos foram analisados utilizando o programa FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Na população de linfócitos foram avaliadas as subpopulações de linfócitos auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ), linfócitos citolíticos ( $CD3^+CD8^+$ ), linfócitos B ( $CD19^+$ ), células NK ( $CD3^-CD56^+CD16^+$ ) e NKT ( $CD3^+CD16^+CD56^+$ ). A partir de gráficos de distribuição pontual de tamanho (dispersão frontal - FSC- *Forward Scatter*) em função da granulosidade (dispersão lateral - SSC- *Side Scatter*) foi identificada a população de linfócitos (P1) (FIGURA 4A). A partir dos eventos em P1 foram construídos histogramas onde delimitamos os linfócitos B ( $CD19^+$ ) com o marcador P2 (FIGURA 4B) e, também, gráficos pontuais de fluorescência para determinar a frequência de linfócitos T auxiliares ( $CD3^+CD4^+$  - Q2) (FIGURA 4C) e linfócitos T citotóxicos ( $CD3^+CD8^+$  - Q2.2) (FIGURA 4D).

Também determinamos a frequência das células NK e NKT. Para isso, a partir dos eventos em P1 foram construídos histogramas onde identificamos as células CD3 negativas (P2) e CD3 positivas (P3) (FIGURA 4E). A partir de P2 e P3 foram construídos gráficos pontuais de fluorescência para determinar a frequência das células NK ( $CD16^+CD56^+CD3^-$ ) e células NKT ( $CD16^+CD56^+CD3^+$ ) (FIGURA 4F).

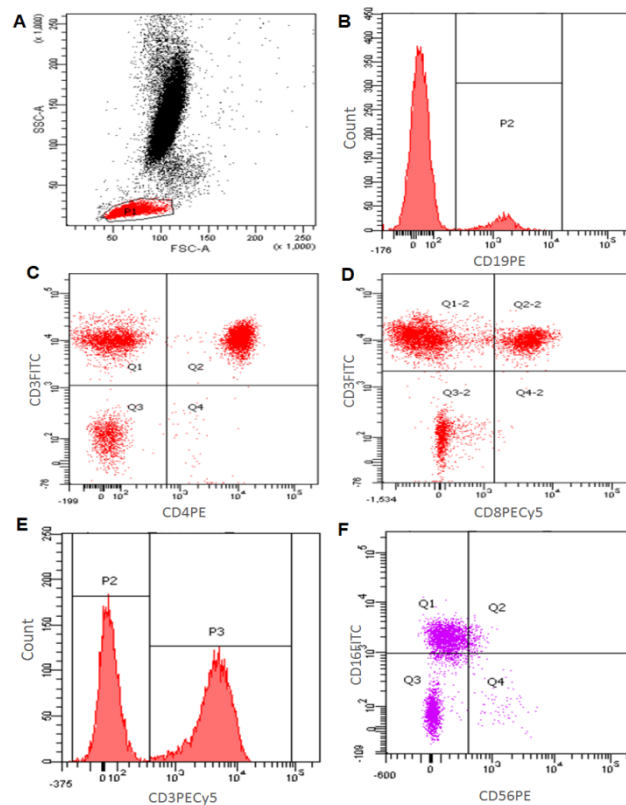


Figura 4- Estratégia de análise do percentual das subpopulações linfocitárias. **(A)** Gráfico de distribuição pontual FSC x SSC, onde estão delimitados os linfócitos (P1). **(B)** Histograma CD19PE para identificação dos linfócitos B ( $CD19^+$ ) delimitados pelo marcador P2. **(C)** Gráfico CD3FITC x CD4PE para identificação dos linfócitos auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ). **(D)** Gráfico CD3FITC x CD8PECy5 para identificação dos linfócitos citotóxicos ( $CD3^+CD8^+$ ). **(E)** Histograma para identificação das células  $CD3^-$  e  $CD3^+$  delimitadas pelo marcador P2 e P3, respectivamente. **(F)** Gráfico CD16FITC x CD56PE para identificação das células NK ( $CD16^+CD56^+CD3^-$ ) e NKT ( $CD16^+CD56^+CD3^+$ ) a partir de P2e P3, respectivamente.

Gráficos de distribuição pontual de FSC x SSC foram utilizados para delimitação dos monócitos (P1) (FIGURA 5A). A partir de P1 foram construídos gráficos pontuais de CD16FITC por CD14PerCP, e delimitada a população  $CD14^+CD16^+$  (P2) (FIGURA 5B). A partir de P2 foram traçados gráficos HLA-DRPE x CD16PerCP para exclusão das células  $CD16^+HLA-DR^-$  (não monócitos – P9) (FIGURA 5C). Após a exclusão das células que não eram monócitos, foram construídos gráficos CD16FITC x CD14PerCP para identificação dos monócitos não clássicos (P4) ( $CD14^+CD16^{++}$ ), intermediários (P5) ( $CD14^{++}CD16^+$ ) e clássicos (P6) ( $CD14^+CD16^-$ ) (FIGURA 5D).

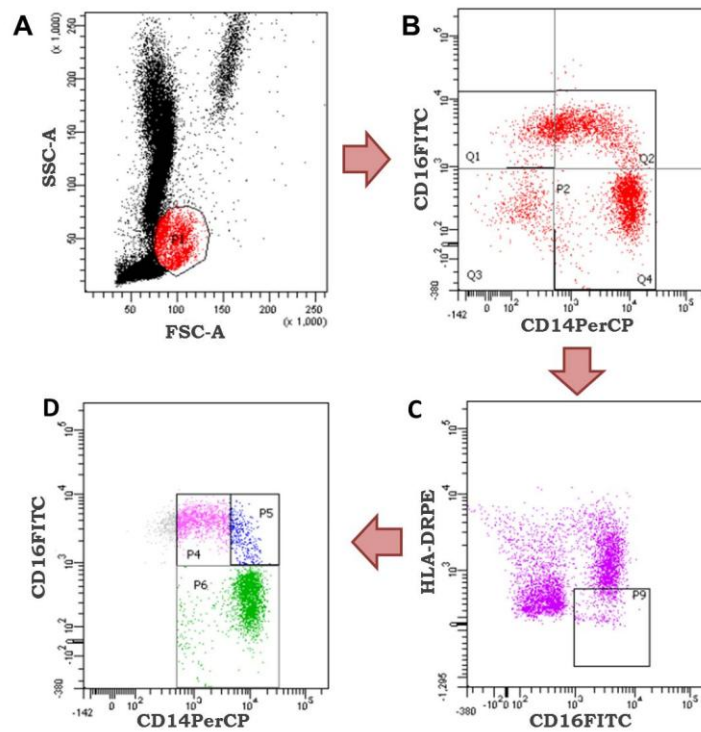


Figura 5- Estratégia para quantificação da subpopulação de monócitos. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC x SSC, onde estão delimitados os monócitos (P1). (B) Gráfico CD16FITC x CD14PerCP para identificação dos monócitos (P2). (C) Gráfico HLA-DRPE x CD16PerCP para exclusão das células CD16<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> (não monócitos). (D) Gráfico CD16FITC x CD14PerCP para identificação dos monócitos não clássicos (P4) (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>), intermediários (P5) (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e clássicos (P6) (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>).

A delimitação dos quadrantes para quantificação da frequência das diferentes subpopulações de linfócitos T e monócitos foi determinada a partir do posicionamento das células marcadas com os controles de isotipo em gráficos pontuais de fluorescência, de maneira que 99% das células ocupassem o quadrante inferior esquerdo.

### 5.9.6 Determinação do conteúdo e fosforilação de proteínas no músculo esquelético

#### 5.9.6.1 Extração e dosagem de proteínas

Amostras de músculos (aproximadamente 50mg) foram homogeneizadas (Bead Ruptor, Omni International) com 200µL de tampão de lise (10% NP40; 1M Tris, pH 7.4; 100 mM pirofosfato de sódio; 200 mM fluoreto de sódio; 0,5 M EDTA, pH 8.0; 100 mM ortovanadato de sódio; 100 mM PMSF; 0.1 leupeptina ml<sup>-1</sup> e 0.1 mg aprotinina ml<sup>-1</sup>). Os lisados foram centrifugados a 2700 *xg* (5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), durante 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado. A concentração de proteínas nos extratos foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (SMITH *et al.*, 1985), utilizando-se a albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A leitura foi realizada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 562 nm.

#### 5.9.6.2 Fracionamento eletroforético

As amostras foram diluídas em tampão Laemmli 4x (SDS 2%; glicerol 20%; EDTA 200 mM; Tris 1M, pH 6.8; azul de bromofenol; ditiotretitol 10%), e aquecidas a 95° C por 5 minutos. Aproximadamente 60 a 100 µg das proteínas totais foram fracionados em gel de poliacrilamida (8 ou 12%) contendo duodecil sulfato de sódio (20%) (SDS-PAGE). Aos géis foram também aplicados 8 µL do padrão de peso molecular (*Page Ruler Protein Ladder*, Fermentas, EUA). A eletroforese foi realizada por aproximadamente 2 horas com uma voltagem entre 50 e 120 volts.

#### 5.9.6.3 Transferência das proteínas e bloqueio

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) previamente umedecida em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%). A transferência foi realizada a uma amperagem constante de 350mA, durante 2 horas, a 4°C. Após a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau* 0,1% para visualização da eficiência do procedimento e padrão de similaridade das bandas. As membranas foram lavadas para retirada do corante e bloqueadas com BSA 5% em tampão contendo tampão tris salina (TBS)-*tween* 0,1% (NaCl 5M, Tris 1M, pH 7,6 e *tween*-20 0,1% ), por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação.



#### 5.9.6.4 Reação com anticorpos e detecção

As membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 min com TBS-*tween* 0,1% e incubadas com anticorpos primários (1:1000) a 4°C, sob agitação, overnight. As membranas foram lavadas novamente em TBS-*tween* 0,1%, 3 vezes, 5 min, e incubadas por 120 minutos a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (1:2000) ligado à peroxidase. A relação dos anticorpos utilizados está descrita na Tabela 3.

Tabela 3- Relação dos anticorpos utilizados para detecção das proteínas do músculo esquelético.

<b>Anticorpo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Fonte</b>	<b># catálogo</b>
Phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)	policlonal	coelho	9251 <sup>A</sup>
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	policlonal	coelho	9211 <sup>A</sup>
Phospho-ERK1/2	policlonal	coelho	9102 <sup>A</sup>
Phospho-AKT (Ser473)	policlonal	coelho	9271 <sup>A</sup>
Phospho-IRS-1(Ser612) (C15H5)	policlonal	coelho	44816 <sup>B</sup>
Phospho-AS160(Thr642)	monoclonal	coelho	8881 <sup>A</sup>
GLUT4 (1F8)	monoclonal	mouse	2213 <sup>A</sup>
HSP72	monoclonal	mouse	ADI-SPA-8132 <sup>C</sup>
βHAD	policlonal	coelho	19828-1-AP <sup>D</sup>
COXIV (3E11)	monoclonal	coelho	4850 <sup>A</sup>
TFAM	policlonal	coelho	7495 <sup>A</sup>
PGC1α	monoclonal	mouse	ST1202 <sup>E</sup>
Phospho-CaMKII (Thr286)	policlonal	coelho	3361 <sup>A</sup>
GAPDH (14C10)	monoclonal	coelho	2118 <sup>A</sup>
Anti-coelho IgG ligado a HRP		Cabra	7074

<sup>A</sup>Cell Signaling. <sup>B</sup>Life Sciences. <sup>C</sup>TermoFisher. <sup>D</sup>Proteintech. <sup>E</sup>Calbiochem

Após três sessões de lavagens, por 5 min com TBS-*tween* 0,1%, as membranas foram incubadas em solução *Luminata Forte* (Milipore) por 3 minutos. O sinal gerado pelas bandas foi captado por sistema de fotodocimentação e a quantificação foi feita pelo *software* Image J(1.45s, Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland). A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como normalizadora para todas as proteínas analisadas. Os valores do conteúdo relativo gerados são apresentados como unidades arbitrárias. Os dados foram relativizados pelo controle, que foi considerado como 100%.

#### 5.9.7 Análise estatística

O n da amostra foi estimado com base no estudo de O’Leary *et al.* (2006), sendo utilizada a variável insulina plasmática em jejum. Obtemos um n de nove voluntários para cada grupo.

Para análise estatística dos dados utilizou-se o *software* Statistica (v10.0, StatSoft, Inc). O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. Para comparar os dados de caracterização entre os grupos utilizou-se a análise de variância simples (*one-way* ANOVA) para dados que apresentaram distribuição normal e o teste de Kruskal Wallis para aqueles dados com distribuição não normal. Para avaliar o efeito do treinamento sobre os parâmetros estudados, nos diferentes grupos, utilizou-se a análise de medidas repetidas (*two-way* ANOVA) quando os dados apresentaram distribuição normal e o teste de Friedman para os dados com distribuição não normal. Quando as diferenças foram significativas, os testes foram seguidos do *post hoc* de Tukey ou *post hoc* de Newman-Keuls (dependendo do coeficiente de variação dos dados). Para testar a presença de correlação entre as variáveis utilizamos os testes de correlação de Pearson (distribuição normal) ou de Spearman (distribuição não normal). Foi adotado o nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Caracterização antropométrica, bioquímica e de condicionamento físico dos participantes do estudo e resposta fisiológica às sessões de treinamento

Na tabela 4 estão apresentados os dados de caracterização antropométrica e de condicionamento físico dos participantes do estudo. Cada grupo experimental foi constituído por 9 voluntários que foram pareados de acordo com a idade, sendo 3 indivíduos do sexo masculino e 6 do feminino em cada grupo. Ao final do estudo, uma voluntária do grupo OBR foi excluída por iniciar terapia medicamentosa que poderia interferir nas variáveis de interesse do presente estudo.

Os valores referentes à idade, estatura,  $VO_2$ máx e potência máxima no teste de esforço não foram diferentes entre os grupos. Os dados antropométricos demonstram que os grupos OB e OBR não apresentaram diferenças nos valores de massa corporal, IMC, percentual de gordura, massa gorda, tecido adiposo visceral e circunferência da cintura, mas esses valores foram maiores, em ambos os grupos, comparados ao grupo CON. Os indivíduos do grupo OBR apresentaram maior quantidade de massa magra em relação ao CON (TABELA 4).

Tabela 4- Caracterização antropométrica e de condicionamento físico dos participantes do estudo.

Variáveis	CON	OB	OBR	p
Gênero (H/M)	3/6	3/6	3/5	-
Idade (anos)	29 ± 11	32 ± 10	30 ± 11	0,704
Massa corporal (kg)	60,7 ± 6,2	92,4 ± 12,9*	106,0 ± 19,6*	<0,0001
Estatura (cm)	171,0 ± 12	162,0 ± 10	167,0 ± 11	0,175
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,8 ± 1,7	35,1 ± 3,8*	37,8 ± 4,6*	0,0001
Percentual gordura (%)	28,1 ± 8,6	43,1 ± 8,0*	44,4 ± 8,1*	0,004
CC (cm)	72,0 ± 4,0	103 ± 13*	115 ± 15*	<0,0001
Massa magra (kg)	42,1 ± 8,7	50,8 ± 10,8	57,0 ± 11,6*	0,024
Massa gorda (kg)	16,1 ± 4,0	43,1 ± 8,0*	46,1 ± 13,4*	<0,0001
Tecido adiposo visceral (g)	149 ± 80	1153 ± 431*	1785 ± 754*&	<0,0001
VO <sub>2</sub> máx (ml/(min x kg))	33,1 ± 7,2	27,2 ± 6,8	25,1 ± 6,2	0,331
Potência máx (watts)	146 ± 52	170 ± 66	176 ± 67	0,577

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. \* diferença entre OB e OBR versus CON, & diferença entre OB versus OBR. ANOVA *one-way*. **CON**: eutrófico; **OB**: obeso sensível à insulina; **OBR**: obeso resistente à insulina; IMC: índice de massa corporal. CC: circunferência da cintura; VO<sub>2</sub>máx: consumo máximo de oxigênio.

Em relação às análises bioquímicas, não houve diferenças entre os três grupos para as variáveis glicose de jejum, colesterol total, HDL e LDL plasmáticos. Observamos que o grupo OBR apresentou maiores valores de insulina de jejum, AUC para a insulina, assim como maior índice HOMA1-IR em relação aos demais grupos. Além disso, a AUC para a glicose, a glicemia 2 horas após o TTOG, as concentrações de triglicérides e de VLDL foram superiores no OBR comparados ao CON. Observamos ainda que o índice HOMA-β variou significativamente entre os grupos, sendo que o OBR apresentou maior valor comparados aos demais grupos e o OB apresentou maior valor comparado ao CON (TABELA 5).

Tabela 5- Caracterização metabólica dos participantes do estudo.

Variáveis	CON	OB	OBR	p
Insulina (U/ml)	4,9 ± 2,0	8,8 ± 2,5	20,7 ± 5,9 <sup>*&amp;</sup>	0,0001
Glicose (mg/dl)	86,0 ± 3,0	84,0 ± 10,0	87,0 ± 8,0	0,717
TTOG (mg/dl)	77,0 ± 24,0	87,0 ± 15,0	105,0 ± 20,0 <sup>*</sup>	0,025
HOMA1-IR (mmol)(μU)/l <sup>2</sup>	1,0 ± 0,4	1,8 ± 0,5	4,4 ± 1,4 <sup>*</sup>	<0,0001
HOMAβ(mmol)(μU)/l <sup>2</sup>	77,5 ± 32,8	199,4 ± 129,3 <sup>*</sup>	348,0 ± 144,7 <sup>*&amp;</sup>	<0,0001
AUC glicose (mg/dl <sup>x</sup> min)	11.1 ± 1.3	12.7 ± 2.3	13.9± 2.2 <sup>*</sup>	0,037
AUC insulina (mg/dl <sup>x</sup> min)	5.8 ± 2.298	9.7± 6.1	17.8 ± 8.1 <sup>*&amp;</sup>	0,018
Colesterol total (mg/dl)	189,0 ± 63,0	192,0 ± 26,0	196,0± 30,0	0,957
LDL (mg/dl)	120,0± 46,0	121,0± 27,0	124,0 ± 24,0	0,722
HDL (mg/dl)	52,0± 13,0	50,0 ± 12,0	41,0 ± 5,0	0,109
VLDL (mg/dl)	17,0 ± 8,0	20,0 ± 11,0	31,0 ± 11,0 <sup>*&amp;</sup>	0,030
Triglicérides (mg/dl)	86,0 ± 40,0	102,0 ± 56,0	155,0 ± 58,0 <sup>*&amp;</sup>	0,030

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. \* diferença entre OB e OBR versus CON, & diferença entre OB versus OBR, ANOVA *one-way*. **CON**: eutrófico; **OB**: obeso sensível à insulina; **OBR**: obeso resistente à insulina; **TTOG**: teste de tolerância oral à glicose. **HOMA1-IR**: modelo de avaliação homeostática da resistência à insulina. **HOMA-β**: modelo de avaliação homeostática da secreção das células beta pancreáticas. **LDL**: lipoproteína de baixa densidade. **HDL**: lipoproteína de alta densidade. **VLDL**: lipoproteína de muito baixa densidade.

Nesse estudo foi utilizado um protocolo de 8 semanas de HIIT, em que houve um incremento da intensidade do exercício a cada semana. Na figura 6 estão apresentados os dados quanto à média do percentual da frequência cardíaca máxima atingida ao final de cada período de exercício intenso durante a sessão do HIIT, por semana, nos grupos OB e OBR. Não houve diferenças entre os grupos quanto ao percentual da frequência cardíaca máxima atingida em cada semana.

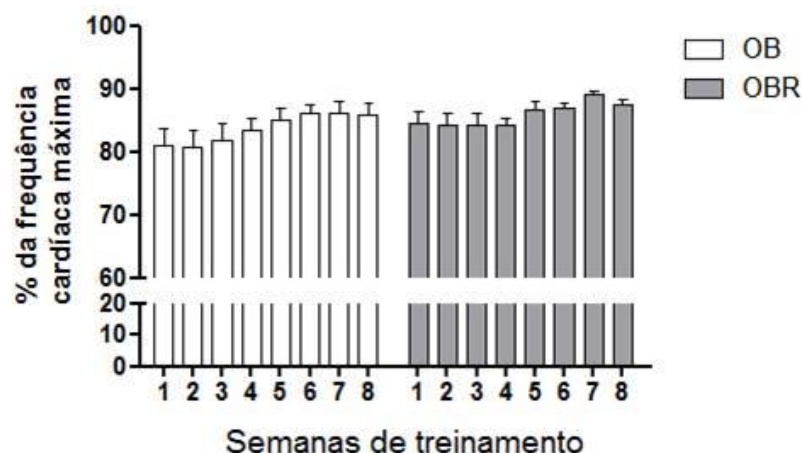


Figura 6- Média do percentual da frequência cardíaca máxima atingida ao final de cada estímulo de exercício durante as semanas de treinamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. **OB**: obeso sensível à insulina (n=9); **OBR**: obeso resistente à insulina (n=8).

Todos os voluntários atingiram a adesão mínima estipulada para serem mantidos no estudo: no OB 5 voluntários completaram as 24 sessões de treinamento (100%), 2 voluntários realizaram 23 sessões (96%), 1 voluntário completou 22 sessões (92%) e 1 voluntário completou 21 sessões (88%). Similarmente, no OBR 5 voluntários completaram as 24 sessões de treinamento (100%), 2 voluntários realizaram 23 sessões (96%), 1 voluntário 22 sessões (92%).

## 6.2 Análise da ingestão alimentar

Na tabela 6 estão apresentados os dados referentes aos registros alimentares que foram realizados em dois momentos. O primeiro registro (inicial) foi realizado antes do início do programa de treinamento. Já o segundo (final), foi realizado na última semana de treinamento. Foram analisados os valores de energia (kcal) e a composição por macronutrientes (proteínas, lipídeos e carboidratos) da dieta dos participantes do estudo. Ao compararmos as avaliações inicial e final, observamos aumento significativo do conteúdo calórico total ( $p=0,002$ ) e da quantidade de carboidratos da dieta ( $p=0,004$ ), independente de grupo. Houve ainda aumento

significativo da quantidade de proteína presente na dieta ( $p=0,002$ ). Já a quantidade de lipídios não foi modificada ( $p=0,16$ ).

Tabela 6- Análise da energia (Kcal) e composição da dieta dos participantes do estudo.

	<b>OB</b>		<b>OBR</b>	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Energia (kcal) <sup>#</sup>	2.820 ± 396	3.030 ± 273	2.941 ± 211	3.119 ± 154
Carboidratos (g/dia) <sup>#</sup>	393 ± 68	438 ± 60	423 ± 38	458 ± 33
Proteínas (g/dia)	135 ± 21	155 ± 20 <sup>*</sup>	134 ± 26	160 ± 24 <sup>*</sup>
Lipídios (g/dia)	78 ± 21	73 ± 11	79 ± 11	71 ± 10

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. <sup>#</sup> efeito do treino. <sup>\*</sup> diferença avaliações inicial e final. OB: obeso sensível à insulina (n= 8) e OBR: obeso resistente à insulina (n= 7).

### 6.3 Efeito do HIIT sobre as variáveis antropométricas e de condicionamento físico

Nesse estudo avaliamos o efeito do HIIT sobre o condicionamento físico e a antropometria dos indivíduos obesos (TABELA 7). Observamos que o HIIT aumentou o condicionamento físico dos indivíduos dos grupos OB e OBR, uma vez que o  $VO_{2max}$  e a potência máxima aumentaram ( $p<0,0001$ ). Após a intervenção, houve redução do percentual de gordura no grupo OB ( $p=0,001$ ). O HIIT promoveu aumento da quantidade de massa magra no grupo OBR ( $p=0,006$ ) e houve uma tendência para esse aumento ( $p=0,06$ ) no OB. Para a quantidade de tecido adiposo visceral houve interação entre grupo e treinamento, caracterizada pelo aumento desse tecido após o treino no grupo OBR ( $p=0,02$ ). Para as variáveis massa corporal, IMC, CC, e quantidade de massa de gordura não houve efeito do HIIT ( $p>0,05$ ).

Tabelas 7- Efeito de 8 semanas de HIIT no condicionamento físico e antropometria de obesos sensíveis e resistentes à insulina.

	OB		OBR	
	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino
VO <sub>2</sub> máx (ml/(min x kg))	27,2 ± 6,8	30,5 ± 3,4 <sup>*</sup>	24,8 ± 5,9	27,4 ± 6,1 <sup>*</sup>
Potência máx (watts)	170,0 ± 66,0	198,0 ± 70,0 <sup>*</sup>	174,0 ± 63,0	200,0 ± 73,0 <sup>*</sup>
Massa corporal (kg)	92,4 ± 12,9	92,1 ± 13,1	106,2 ± 18,4	107,0 ± 19,6
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,1 ± 3,8	34,9 ± 3,7	37,8 ± 4,3	38,0 ± 4,7
Percentual de gordura	43,1 ± 8,0	42,3 ± 8,0 <sup>*</sup>	44,6 ± 7,6	44,3 ± 8,1
CC (cm)	103,0 ± 13,0	102,0 ± 12,0	115,0 ± 15,0	116,0 ± 13,0
Massa magra (kg)	50,8 ± 10,8	51,6 ± 11,1	56,9 ± 10,9	57,6 ± 11,6 <sup>*</sup>
Massa gorda (kg)	38,7 ± 9,0	37,4 ± 8,5	46,4 ± 12,6	46,5 ± 13,4
Tecido adiposo visceral (g)	1153 ± 431	1072 ± 430	1737 ± 720	1861 ± 872 <sup>*</sup>

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. \*diferença pré e pós-treino. OB: obeso sensível à insulina; OBR: obeso resistente à insulina; IMC: índice de massa corporal. CC: circunferência da cintura. VO<sub>2</sub>máx: consumo máximo de oxigênio.

#### 6.4 Efeito do HIIT sobre as variáveis bioquímicas

Na tabela 8 é apresentado o efeito do HIIT sobre os parâmetros de perfil lipídico. Observamos que o treinamento promoveu redução das concentrações de colesterol total (p=0,03) e LDL (p=0,03), independente do grupo. Para as demais variáveis, não houve efeito do treinamento: HDL (p=0,23), VLDL (p=0,40), e triglicérides (p=0,39).



Tabela 8- Efeito de 8 semanas de HIIT no perfil lipídico de obesos sensíveis e resistentes à insulina.

	<b>OB</b>		<b>OBR</b>	
	Basal	Pós-treino	Basal	Pós-treino
Colesterol total (mg/dl) <sup>#</sup>	192 ± 26	179 ± 36	196 ± 30	181 ± 21
LDL (mg/dl) <sup>#</sup>	121 ± 27	103 ± 33	124 ± 24	113 ± 20
HDL (mg/dl)	50 ± 12	56 ± 15	41 ± 5	41 ± 10
VLDL (mg/dl)	20 ± 11	19 ± 6	31 ± 11	27 ± 11
Triglicérides (mg/dl)	102 ± 56	96 ± 31	155 ± 58	137 ± 56

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão.<sup>#</sup> efeito do treinamento. OB: obeso sensível à insulina; OBR: obeso resistente à insulina; LDL: lipoproteína de baixa densidade. HDL: lipoproteína de alta densidade. VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.

Na figura 7 são apresentados os dados referentes à sensibilidade à insulina. Observamos uma interação significativa entre treinamento e grupo: o HIIT promoveu no grupo OBR redução da concentração de insulina ( $p=0,004$ ), do índice HOMA-IR ( $p=0,02$ ) e do índice HOMA- $\beta$  ( $p=0,01$ ). Não houve efeito do HIIT sobre o ISMI ( $p=0,36$ ), embora no grupo OBR dos 5 voluntários avaliados, 4 apresentaram aumento desse índice. Adicionalmente, encontramos uma correlação negativa entre os valores de HOMA-IR e ISMI após o HIIT ( $p=0,01$  e  $r= -0,71$ ).

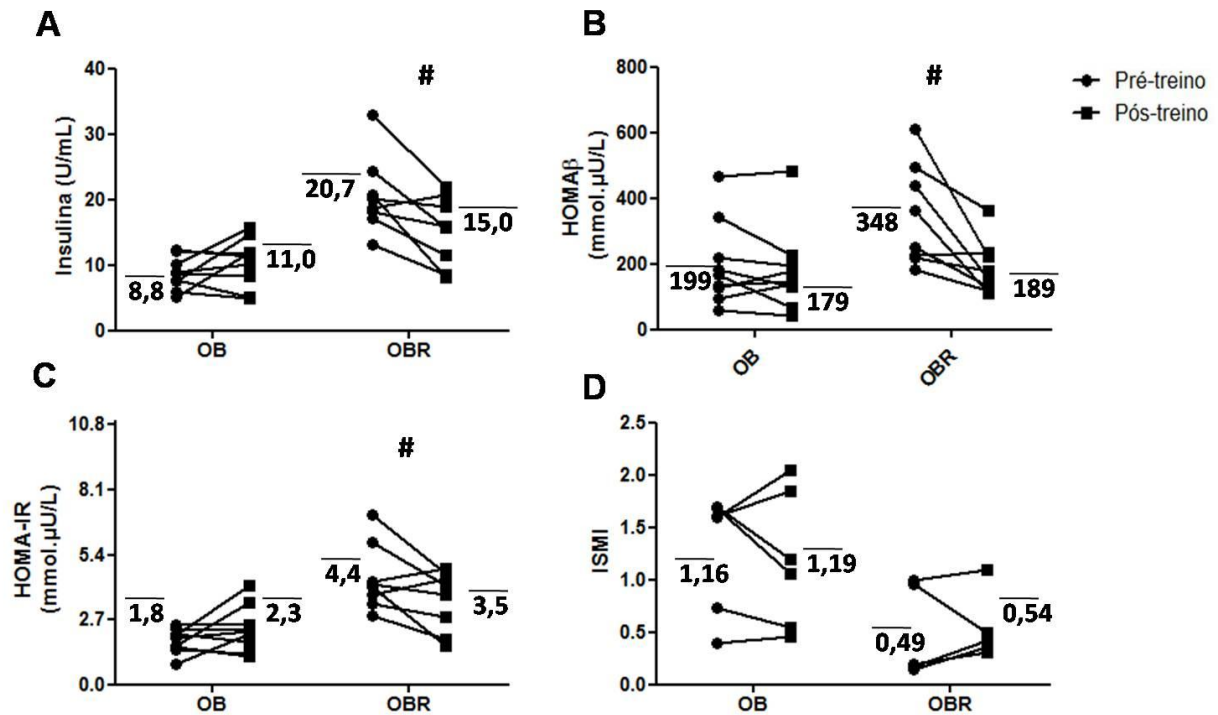


Figura 7- Efeitos do HIIT na concentração de insulina (A), HOMA-β (B), HOMA-IR (C) e ISMI (D). #diferença entre pré e pós-treino. Para insulina, HOMA-β e HOMA-IR: OB (n=9); OBR (n=8). Para ISMI :OB (n=6) e OBR (n=5). HOMA-β: avaliação homeostática da função das células beta pancreáticas; HOMA-IR: avaliação homeostática da resistência à insulina; ISMI: índice de sensibilidade muscular à insulina.

Analizamos também o efeito do HIIT nas concentrações de glicose e insulina durante cada ponto do TTOG de 2 horas e também sobre a glicose e insulina em 120 min (AUC) (FIGURA 8). Em relação às concentrações de insulina, não houve diferença em qualquer ponto ( $p>0,05$ ). Os valores da AUC para a insulina também não foram modificados pelo HIIT ( $p=0,78$ ). Para os dados de glicose, no tempo de 60 minutos houve interação significativa entre grupo e treinamento ( $p=0,004$ ), caracterizada pelo aumento da glicose no OBR. Para os demais pontos não houve diferença ( $p>0,05$ ). Do mesmo modo, a AUC para glicose não foi modificada ( $p=0,11$ ) pelo HIIT.

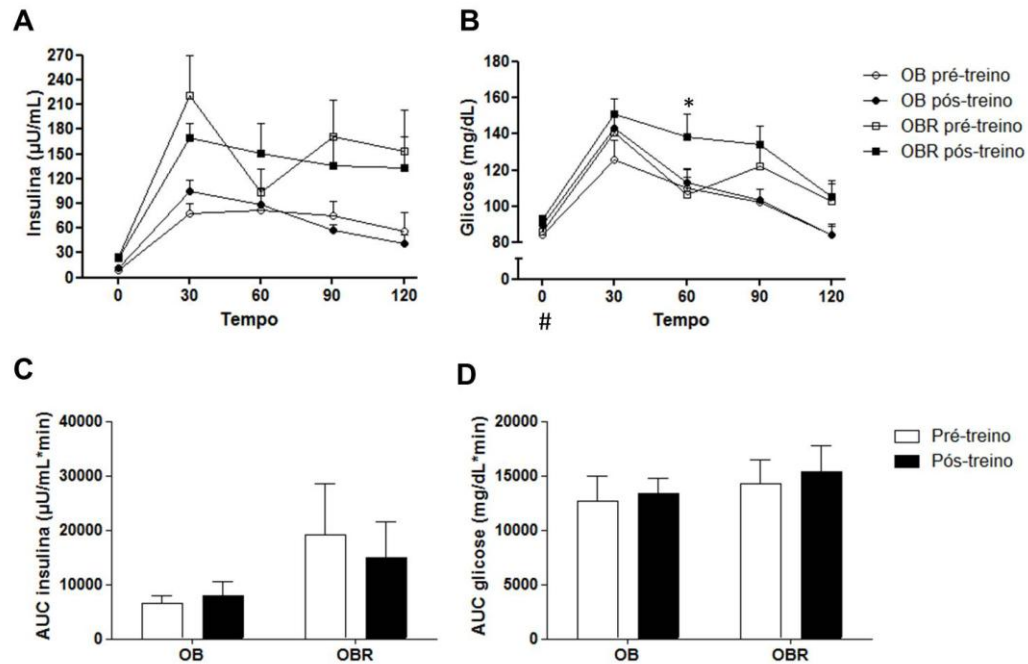


Figura 8- Efeitos do HIIT na concentração de glicose (A) e de insulina (B) durante o teste de tolerância oral à glicose nos pontos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. AUC para insulina (C) e para glicose (D). \* diferença entre pré e pós-treino. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. OB: obeso sensível à insulina (n=7); OBR: obeso resistente à insulina (n=5). AUC: área sob a curva.

### 6.5 Análise e efeito do HIIT sobre o estado oxidativo

Para avaliação dos marcadores de estado oxidativo foram realizadas as quantificações do estresse oxidativo (peroxidação lipídica) e atividade de enzimas antioxidantes. Avaliamos no plasma a peroxidação lipídica, a partir do método de TBARS, e a capacidade antioxidante total (FRAP). Já nos eritrócitos, nós também avaliamos a peroxidação lipídica e ainda a atividade das enzimas CAT e SOD. Ao compararmos os 3 grupos, observou-se diferença quanto a concentração de TBARS nos eritrócitos dos grupos OB e OBR em relação ao controle. Para a concentração de TBARS plasmático, CAT, SOD e FRAP não houve diferenças entre os grupos (TABELA 9).

Tabela 9 - Análise do estado oxidativo dos participantes do estudo.

	CON	OB	OBR	p
TBARS eritrócitos (nmol MDA/mg prot)	1,62 ± 0,49	3,37 ± 1,56*	4,32 ± 1,73*	0,004
TBARS plasmático (nmol MDA/mg prot)	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,75
Catalase (ΔE/min/mg prot)	2,90 ± 1,14	2,50 ± 0,85	2,78 ± 1,27	0,80
SOD (U/mg de prot)	3,67 ± 3,39	2,26 ± 1,13	2,11 ± 1,09	0,37
FRAP (g de FeSO4/mg de prot)	0,91 ± 0,88	0,89 ± 0,54	1,00 ± 0,48	0,94

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão para os grupos CON, OB e OBR. \*diferença entre OB e OBR versus CON. SOD: superóxido dismutase. FRAP: Ferric reducing ability of plasma.

Como houve diferença para a concentração de TBARS nos eritrócitos entre os grupos, analisamos a presença de correlação dessa variável com alguns dados antropométricos e bioquímicos. Observamos a presença de correlação positiva entre a concentração de TBARS nos eritrócitos com o IMC, percentual de gordura e concentração de insulina. Para as demais variáveis testadas não houve correlação (TABELA 10).

Tabela 10- Correlações da concentração de TBARs nos eritrócitos com variáveis bioquímicas e antropométricas.

Variáveis	TBARs (nmol MDA/mg proteína)	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Percentual de gordura (%)	0,404	0,045*
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	0,516	0,008*
Insulina (U/ml)	0,406	0,043*
HOMA1-IR(mmol)(μU)/I <sup>2</sup>	0,379	0,061
Triglicérides (mg/dl)	0,008	0,967

\*correlação significativa.

Ao avaliarmos o efeito do HIIT sobre o estado oxidativo, não observamos modificação na concentração de TBARS nos eritrócitos e no plasma, assim como na atividade das enzimas CAT, SOD, e FRAP (TABELA 11).

Tabela 11 – Efeito de 8 semanas de HIIT no estado oxidativo de indivíduos sensíveis e resistentes à insulina.

	<b>OB</b>		<b>OBR</b>		<b>p</b>
	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino	
TBARS eritrócitos	3,37 ± 1,56	4,32 ± 2,87	4,32 ± 1,73	3,39 ± 1,28	0,99
TBARS plasma	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,26
Catalase	2,50 ± 0,85	1,99 ± 0,66	2,78 ± 1,27	2,65 ± 1,20	0,43
SOD	2,26 ± 1,13	2,70 ± 0,99	2,11 ± 1,09	3,47 ± 2,27	0,22
FRAP	0,89 ± 0,54	1,02 ± 0,67	1,00 ± 0,48	1,51 ± 0,89	0,10

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão para os grupos OB e OBR. Unidades de medida apresentadas na tabela 9. Valor de p referente ao efeito do treinamento.

## 6.6 Análise e efeito do HIIT sobre citocinas

Foram realizadas análises da concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no soro dos participantes. Ao compararmos os grupos não observamos diferenças para o TNF- $\alpha$  (p=0,14), IL-6 (p=0,50) ou IL-10 (p=0,46) (TABELA 12).

Tabela 12- Análise da concentração de citocinas no soro dos participantes do estudo.

	<b>CON</b>	<b>OB</b>	<b>OBR</b>
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	9,3 $\pm$ 9,6	10,3 $\pm$ 10,6	23,2 $\pm$ 15,6
IL-6 (pg/mL)	1,30 $\pm$ 1,22	12,3 $\pm$ 20,9	16,5 $\pm$ 23,1
IL-10 (pg/mL)	0,02 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,67

Concentração no soro das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Não observamos efeito do HIIT sobre a concentração do TNF- $\alpha$  (p=0,80), IL-6 (p=0,59) ou IL-10 (p=0,26) (TABELA 13).

Tabela 13- Efeito de 8 semanas de HIIT na concentração de citocinas no soro dos participantes do estudo.

	<b>OB</b>		<b>OBR</b>	
	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	10,3 $\pm$ 10,6	19,0 $\pm$ 11,2	23,2 $\pm$ 15,6	13,1 $\pm$ 9,0
IL-6 (pg/mL)	12,3 $\pm$ 20,9	9,5 $\pm$ 10,4	16,5 $\pm$ 23,1	3,6 $\pm$ 3,2
IL-10 (pg/mL)	0,03 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,22	0,37 $\pm$ 0,67	0,02 $\pm$ 0,03

Concentração no soro das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 nos grupos OB e OBR nos momentos pré e após o treino. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. OB (n= 8) e OBR (n= 7).

## 6.7 Análise e efeito do HIIT sobre a contagem de leucócitos

Na tabela abaixo estão apresentados os dados quanto à contagem global e diferencial dos leucócitos sanguíneos no momento pré-treino. Ao compararmos os grupos não observamos diferença para o número de leucócitos totais (p=0,29), neutrófilos (p=0,41) e monócitos (p=0,13). Já em relação aos linfócitos, encontramos essas células em maior número no grupo OBR comparado aos demais grupos (p=0,01).

Tabela 14- Análise da contagem global e diferencial de leucócitos dos participantes do estudo.

	CON	OB	OBR
Leucócitos (células/ml)	6,744± 2,366	7,656± 1,713	8,400±1,882
Neutrófilos (células/ml)	3,769± 1769	4,574± 1,138	4,595± 1,381
Linfócitos (células/ml)	2,442± 722	2,508± 460	3,479± 871* <sup>&amp;</sup>
Monócitos (células/ml)	357± 181	414± 260	597± 287

Contagem global e diferencial dos leucócitos nos grupos CON, OB e OBR. Dados expressos como média ± desvio padrão. \* diferença entre OBR e CON, <sup>&</sup>diferença entre OBR e OB.

Posteriormente, foi avaliada a presença de correlação do número de linfócitos com alguns dados antropométricos e bioquímicos. Observamos a presença de correlação positiva entre a contagem de linfócitos com a concentração de insulina e HOMA-IR. Para as demais variáveis testadas não houve correlação (TABELA 15).

Tabela 15- Correlações da contagem de linfócitos com variáveis bioquímicas e antropométricas.

Variáveis	Linfócitos (células/ml)	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Insulina (U/ml)	0,602	0,001*
HOMA1-IR(mmol)(μU)/l <sup>2</sup>	0,595	0,001*
Triglicérides (mg/dl)	0,291	0,149
Percentual de gordura (%)	0,345	0,084
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	0,355	0,075

\*correlação significativa.

Após o programa de treinamento não encontramos modificações na contagem dessas células: leucócitos totais ( $p=0,93$ ), monócitos ( $p=0,11$ ), linfócitos ( $p=0,39$ ) e neutrófilos ( $p=0,55$ ) (TABELA 16).

Tabela 16- Efeito de 8 semanas de HIIT na contagem global e diferencial de leucócitos dos participantes do estudo.

	OB		OBR	
	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino
Leucócitos	7,656 $\pm$ 1,713	7,900 $\pm$ 4079	8,400 $\pm$ 1,882	8,043 $\pm$ 2,185
Neutrófilos	4,574 $\pm$ 1,138	4,322 $\pm$ 2,457	4,595 $\pm$ 1,381	4,360 $\pm$ 1,221
Linfócitos	2,508 $\pm$ 460	2,842 $\pm$ 1,677	3,479 $\pm$ 871	3,234 $\pm$ 1,062
Monócitos	414 $\pm$ 260	401 $\pm$ 312	597 $\pm$ 287	404 $\pm$ 179

Contagem global e diferencial dos leucócitos em células/ml nos grupos CON, OB e OBR nos momentos pré e após o treino. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 6.8 Análise e efeito do HIIT sobre a frequência das subpopulações leucocitárias

Nesse estudo nós avaliamos a frequência das subpopulações leucocitárias nos diferentes grupos experimentais. Ao compararmos a frequência das subpopulações de linfócitos entre os grupos não encontramos diferenças para o percentual de linfócitos auxiliares ( $p=0,43$ ), linfócitos citolíticos ( $p=0,51$ ) e células NK ( $p=0,26$ ). Contudo, observamos uma maior frequência das células NKT no grupo OBR comparado aos demais grupos ( $p=0,048$ ). Houve diferença ainda quanto à frequência dos linfócitos B ( $p=0,014$ ) que se mostrou aumentada no OB em comparação com outros grupos (FIGURA 9).



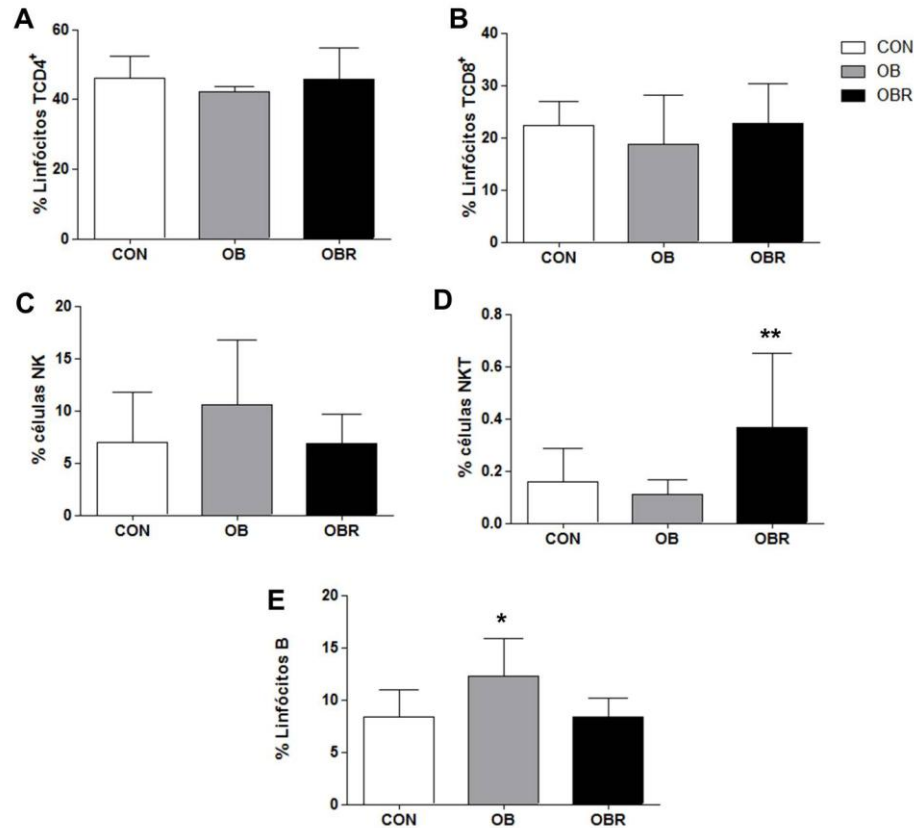


Figura 9- Percentual das subpopulações de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (A), linfócitos TD8<sup>+</sup> (B), (C) células NK, (D) células NKT e (E) linfócitos B nos grupos CON, OB e OBR. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* diferença entre OB versus CON e OBR. \*\* diferença entre OBR versus CON e OB.

Na figura 10 estão apresentados os dados quanto à frequência das subpopulações de monócitos: não clássicos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> (A), intermediários CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> (B) e clássicos CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (C) nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino. Ao compararmos os três grupos, observamos maior frequência dos monócitos não clássicos nos grupos de obesos em relação ao CON ( $p=0,009$ ), sem diferenças entre OB e OBR. A frequência dos monócitos intermediários e clássicos não foi diferente entre os grupos ( $p=0,99$  e  $p=0,11$ , respectivamente).

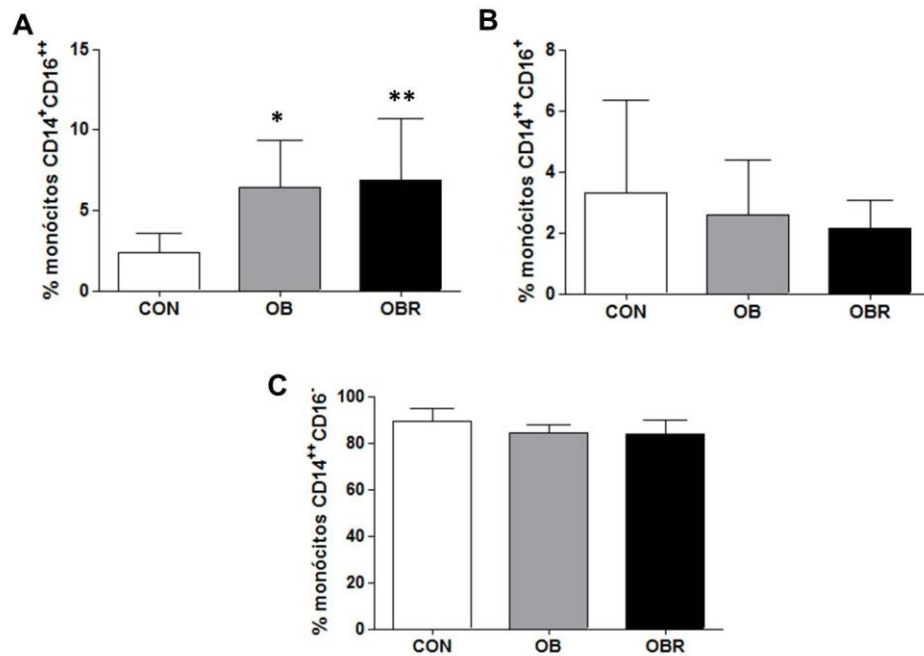


Figura 10- Percentual das subpopulações de monócitos não clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (A), intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) (B) e clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) (C) nos grupos CON, OB e OBR. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \* diferença entre OB versus CON. \*\* diferença entre OBR versus CON. CON (n= 8), OB (n= 8) e OBR (n= 8).

Considerando a maior frequência dos monócitos não clássicos nos obesos, realizamos a análise de correlação dessa variável com dados antropométricos, metabólicos, estresse celular e citocinas circulantes. Observou-se a presença de correlação positiva entre a frequência dos monócitos não clássicos e o IMC, percentual de gordura e TBARS nos eritrócitos. Não foi encontrada correlação para as demais variáveis testadas (TABELA 17).

Tabela 17 - Correlação entre a frequência dos monócitos não clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) e variáveis antropométricas e bioquímicas.

Variáveis	% células CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup>	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Percentual de gordura (%)	0,534	0,007*
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	0,513	0,010*
Tecido adiposo visceral (g)	0,215	0,312
Insulina (U/ml)	0,237	0,264
HOMA1-IR (mmol)(μU)/l <sup>2</sup>	0,234	0,272
Triglicérides (mg/dl)	0,020	0,923
TBARS eritrócitos (nmol MDA/mg proteína)	0,423	0,044*
TNF-α (pg/ml)	-0,117	0,594
IL-6 (pg/ml)	0,116	0,598
IL-10 (pg/ml)	0,289	0,193

\*correlação significativa.

Posteriormente nós avaliamos se a frequência dessas células seria modulada em indivíduos obesos sensíveis e resistentes à insulina após o HIIT. Observamos que a frequência das diferentes subpopulações de linfócitos não foi modificada por essa intervenção (linfócito auxiliar: p=0,40; linfócito citolítico: p=0,51; células NK: p=0,55; células NKT: p=0,11; linfócito B: p=0,73). Assim como não alterou também a frequência dos monócitos clássicos (p=0,50), intermediários (p=0,31) ou não clássicos (p=0,50) (TABELA 18).

Tabela 18- Efeito de 8 semanas de HIIT na frequência das subpopulações leucocitárias de indivíduos obesos sensíveis e resistentes à insulina.

%	OB		OBR	
	Pré-treino	Pós-treino	Pré-treino	Pós-treino
Linfócitos auxiliares	42,1 ± 1,7	44,4 ± 6,0	45,7 ± 9,0	45,3 ± 8,4
Linfócitos citolíticos	18,7 ± 9,4	18,9 ± 9,5	22,8 ± 7,6	23,0 ± 7,9
Células NK	10,6 ± 6,1	8,8 ± 5,3	6,9 ± 2,8	6,6 ± 3,2
Células NKT	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,3
Linfócitos B	12,3 ± 3,6	13,6 ± 4,3	8,4 ± 1,7	8,0 ± 2,6
Monócitos clássicos	84,4±3,3	85,0±5,1	84,1±6,0	80,2±9,7
Monócitos intermediários	2,6±1,8	2,6±1,8	2,2±0,9	3,5±1,6
Monócitos não clássicos	6,4 ± 2,9	5,3 ± 1,6	6,8 ± 3,9	5,9 ± 3,6

Os dados estão expressos como média ± desvio padrão para os grupos. OB: obeso sensível à insulina e OBR: obeso resistente à insulina (n= 8); NK: células natural killer; NKT: células T natural killer.

## 6.9 Análise e efeito do HIIT sobre proteínas musculares

Na figura 12 estão apresentados os dados quanto à fosforilação e conteúdo de proteínas da via de sinalização da insulina. Em relação à fosforilação do IRS (Tyr 612) não encontramos diferenças significativas entre os voluntários (p=0,17). De forma similar, ao compararmos a fosforilação da Akt (Ser 473) (p=0,93) e a expressão do GLUT4 (p=0,21) entre os grupos não observamos diferenças. Analisamos também a fosforilação da AS160 (Thr 642) e encontramos menor fosforilação dessa proteína nos grupos OB e OBR em relação ao controle (p=0,03), sem diferenças entre os obesos. Posteriormente, avaliamos se um programa de HIIT modularia esses componentes em indivíduos obesos. Observamos que o treinamento, independente do grupo, aumentou a fosforilação do IRS (Tyr 612) (p=0,04) e a fosforilação da Akt (Ser 473) (p=0,03). Já a fosforilação da AS160 (Thr 642) (p=0,91) e o conteúdo do GLUT4 (p=0,32) não foram alteradas pelo HIIT (FIGURA 11).

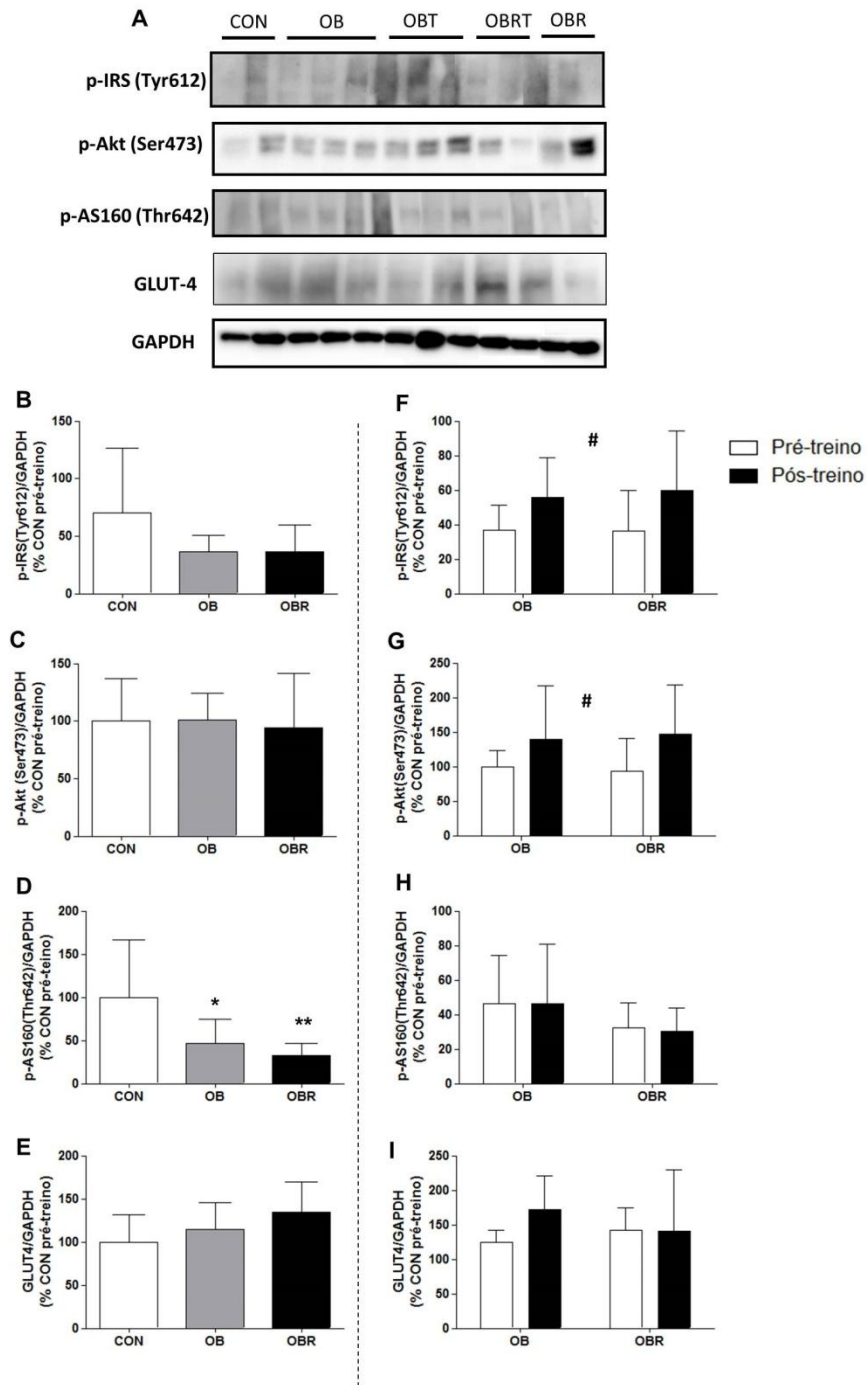


Figura 11- Blot representativo (**A**) e dados da fosforilação do IRS (Tyr 612), Akt (Ser 473), AS160 (Thr 642) e conteúdo do GLUT4 no músculo esquelético nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino (**B**, **C**, **D** e **E**) e nos grupos OB e OBR antes e após o HIIT (**F**, **G**, **H** e **I**). Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão, considerando o controle como 100%. CON: eutrófico; OB: obeso sensível à insulina pré-treino; OBT: obeso sensível à insulina pós-treino; OBR: obeso resistente à insulina pré-treino e OBRT: obeso resistente à insulina pós-treino. \* diferença entre OB e CON no basal. \*\* diferença entre OBR e CON no basal. # efeito do treinamento. CON (n=3-5), OB (n=7-8) e OBR (n=6-7).

Foram realizadas também análises da fosforilação de proteínas da via das MAPKs no músculo esquelético. Em relação à fosforilação da JNK1/2 ( $p=0,85$ ) e da ERK1/2 ( $p=0,63$ ) não observamos diferenças significativas entre os grupos. Já em relação à p38, observamos maior fosforilação dessa proteína no OBR em relação ao CON ( $p=0,03$ ). Investigamos também se as proteínas da via das MAPKs seriam moduladas pelo programa de HIIT proposto. Ao analisarmos a fosforilação dessas proteínas encontramos que o HIIT não alterou a fosforilação da JNK1/2 ( $p=0,64$ ) e da p38 ( $p=0,79$ ). No entanto, observamos efeito do HIIT em reduzir a fosforilação da ERK1/2 no grupo OBR ( $p=0,01$ ) (FIGURA12).

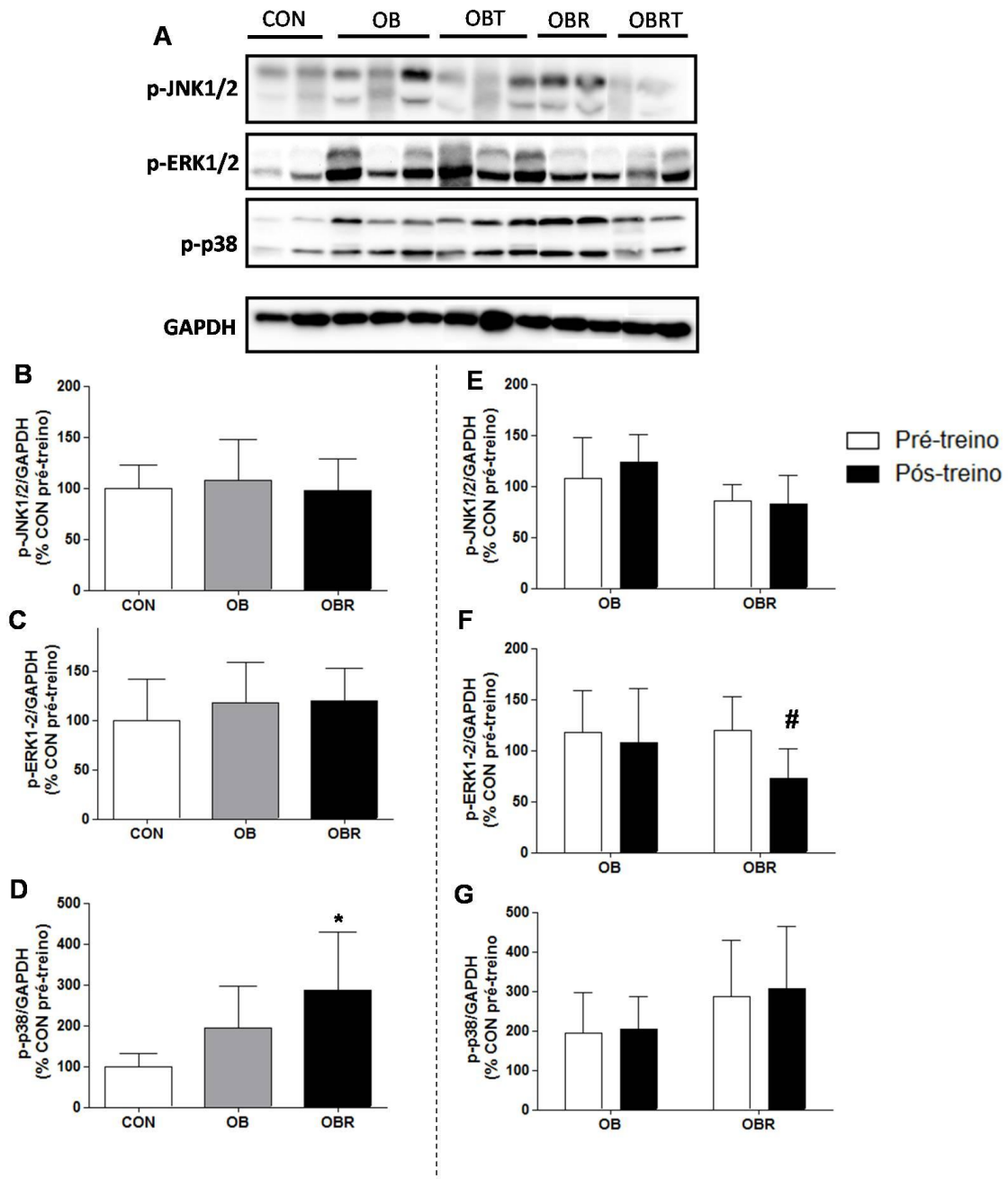


Figura 12- Blot representativo (A) e dados da fosforilação do JNK1/2, ERK1/2/p38 no músculo esquelético nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino (B, C e D) e nos grupos OB e OBR antes e após o HIIT (E, F e G). Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão, considerando o controle como 100%. CON: eutrófico; OB: obeso sensível à insulina pré-treino; OBT: obeso sensível à insulina pós-treino; OBR: obeso resistente à insulina pré-treino e OBRT: obeso resistente à insulina pós-treino.\*indica diferença entre OBR e CON no pré-treino.# efeito do treinamento.CON (n=3-5), OB (n=7-8) e OBR (n=6-7).

Nesse estudo também foram avaliadas algumas proteínas relacionadas à biogênese e função mitocondrial no músculo esquelético. Observamos que a fosforilação da CAMKII ( $p=0,27$ ), assim como o conteúdo do PGC-1 $\alpha$  ( $p=0,24$ ) e do Tfam ( $p=0,97$ ) não foram diferentes entre os grupos. Ao analisarmos o efeito do HIIT nessas proteínas, nos grupos de obesos, foi possível identificar aumento da fosforilação da CAMKII ( $p=0,04$ ). Já para o PGC-1 $\alpha$  ( $p=0,16$ ) e Tfam ( $p=0,76$ ) não houve efeito do HIIT (FIGURA 13).

Na figura 14 são apresentados os dados quanto ao conteúdo das proteínas COX-IV e  $\beta$ -HAD. Não observamos diferenças entre os grupos quanto à expressão tanto da COX-IV ( $p=0,35$ ), quanto da  $\beta$ -HAD ( $p=0,14$ ). Após as 8 semanas de HIIT houve aumento do conteúdo dessas proteínas ao considerarmos os grupos em conjunto ( $p=0,006$  e  $p=0,046$ , respectivamente).



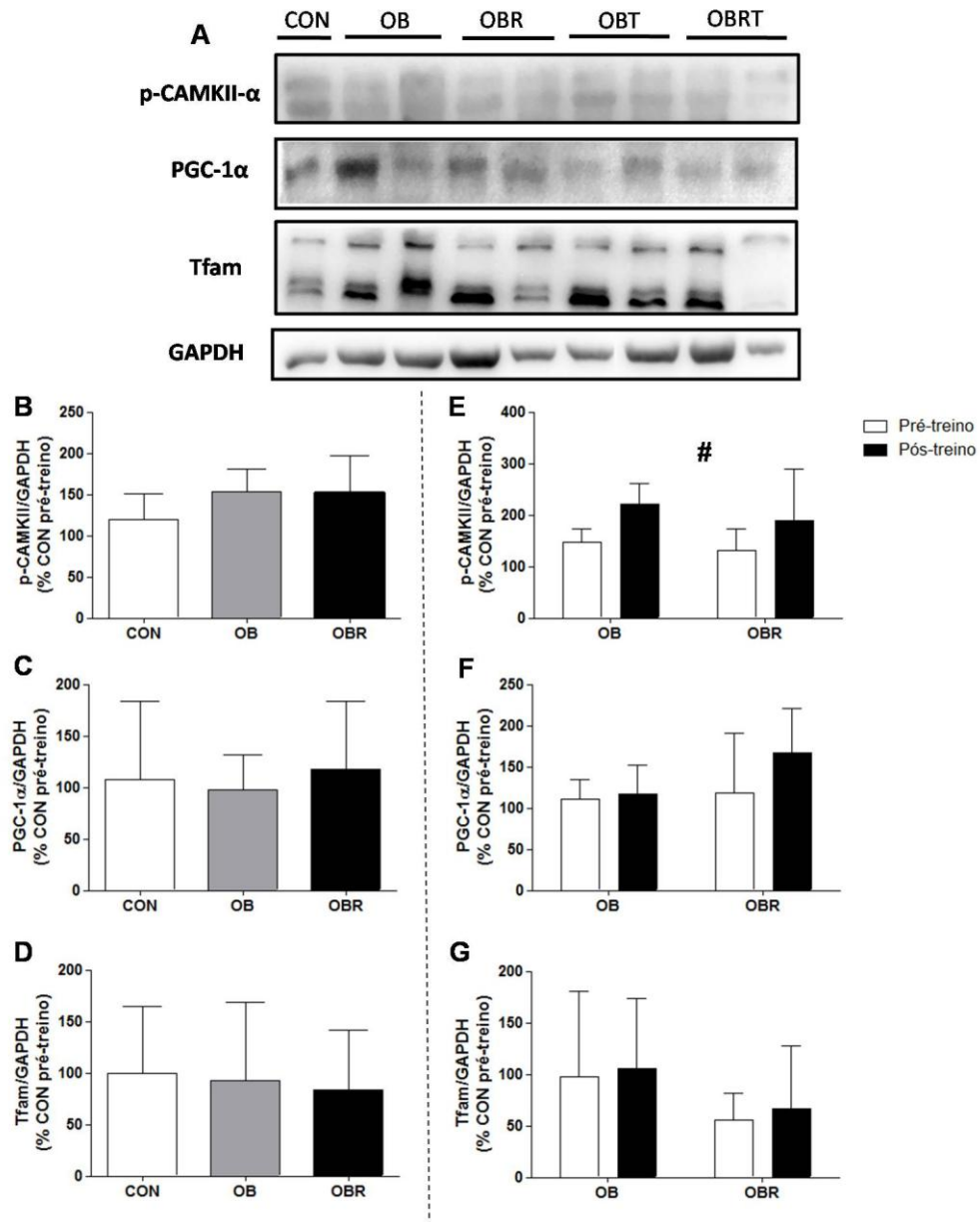


Figura 13- Blot representativo (A) e dados da fosforilação da p-CAMKII e conteúdo do PGC-1α e Tfam no músculo esquelético nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino (B, C e D) e nos grupos OB e OBR antes e após o HIIT (E, F e G). Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão, considerando o controle como 100%. CON: eutrófico; OB: obeso sensível à insulina pré-treino; OBT: obeso sensível à insulina pós-treino; OBR: obeso resistente à insulina pré-treino e OBRT: obeso resistente à insulina pós-treino. # efeito do treinamento. CON (n=5-7), OB (n=3-5) e OBR (n=5).

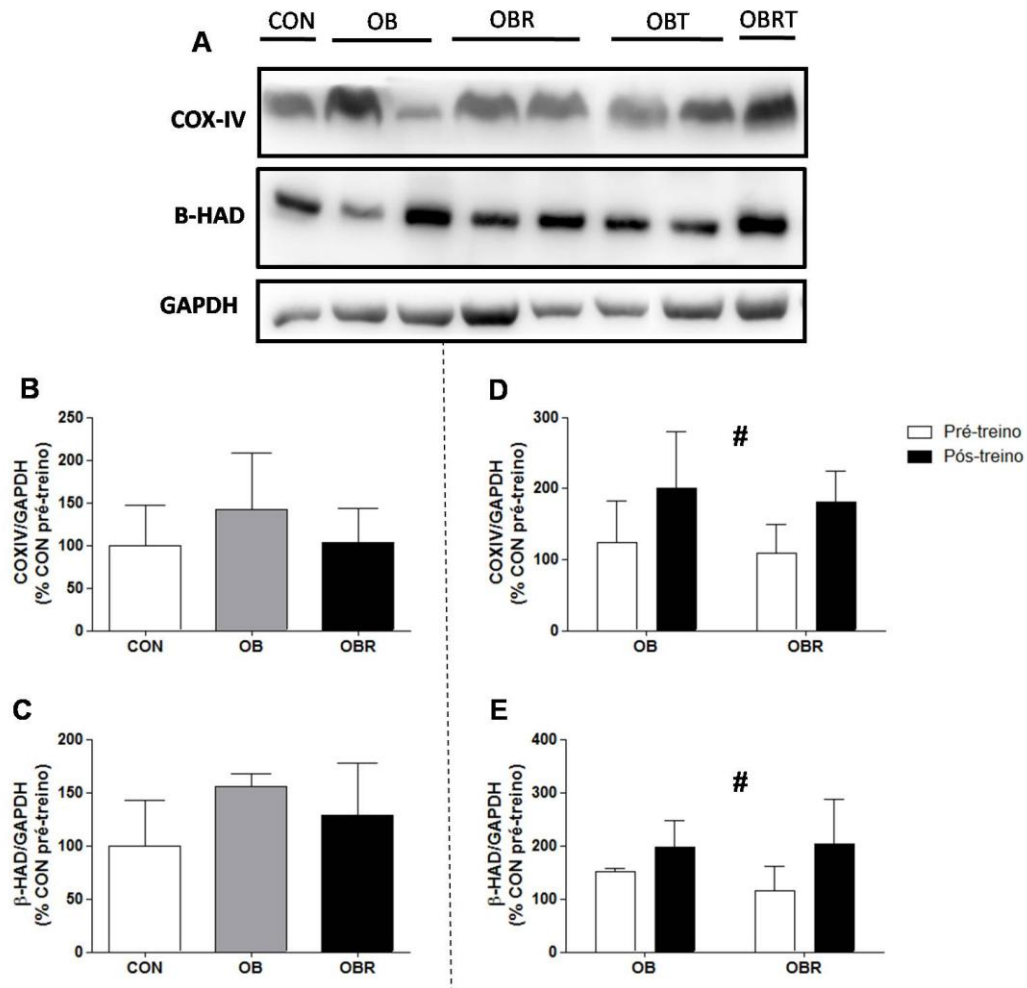


Figura 14- Blot representativo (A) e dados do conteúdo do COX-IV e β-HAD no músculo esquelético nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino (B e C) e nos grupos OB e OBR antes e após o HIIT (D e E). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão, considerando o controle como 100%. CON: eutrófico; OB: obeso sensível à insulina pré-treino; OBT: obeso sensível à insulina pós-treino; OBR: obeso resistente à insulina pré-treino e OBRT: obeso resistente à insulina pós-treino. # efeito do treinamento. CON (n=6-7), OB (n=3-4) e OBR (n=5-6).

Avaliamos também o conteúdo da Hsp72 no músculo esquelético e não observamos diferenças entre os grupos ( $p=0,27$ ). Após o programa de HIIT o conteúdo dessa proteína não foi modificado ( $p=0,43$ ) (FIGURA 15).

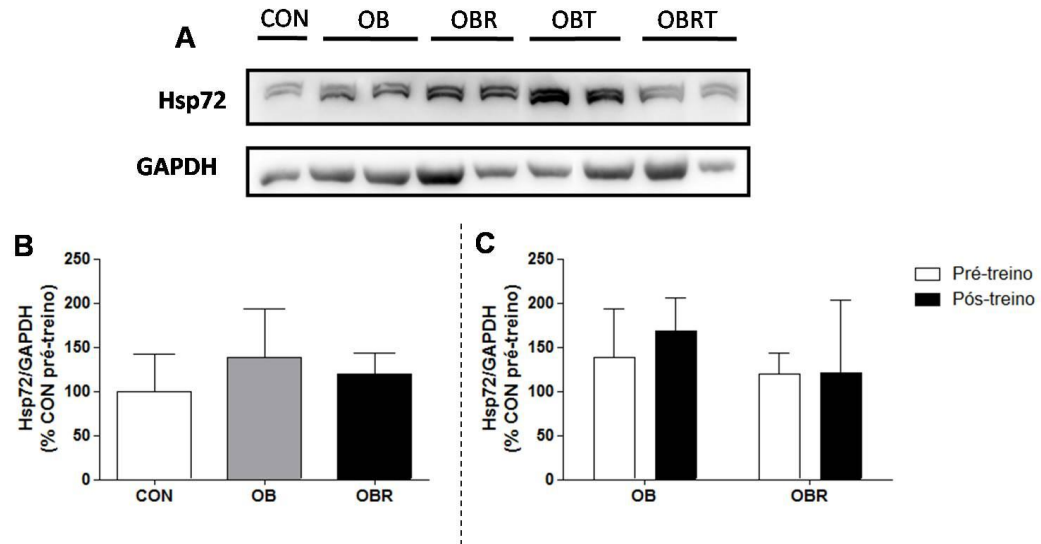


Figura 15- Blot representativo (**A**) e dados do conteúdo da Hsp72 no músculo esquelético nos grupos CON, OB e OBR no pré-treino (**B**) e nos grupos OB e OBR antes e após o HIIT (**C**). Dados da expressão da Hsp72 (**C**) nos grupos OB e OBR antes e após o HIIT. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão, considerando o controle como 100%. CON: eutrófico; OB: obeso sensível à insulina pré-treino; OBT: obeso sensível à insulina pós-treino; OBR: obeso resistente à insulina pré-treino e OBRT: obeso resistente à insulina pós-treino. CON (n=7), OB (n=7) e OBR (n=7).

## 7 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito do treinamento intervalado de alta intensidade em parâmetros bioquímicos, componentes celulares e moleculares que estão envolvidos na resistência à insulina em indivíduos obesos. Esse é o primeiro estudo que comparou esses parâmetros em indivíduos obesos sensíveis ou resistentes à insulina. O principal achado é que 8 semanas de HIIT alteraram componentes da via de sinalização da insulina e do metabolismo oxidativo no músculo esquelético de indivíduos obesos e promoveu melhora da sensibilidade à insulina em obesos resistentes à insulina, independente de mudanças da gordura corporal e de parâmetros inflamatórios.

Nós observamos que o protocolo de HIIT adotado promoveu aumento do  $VO_{2max}$  e da potência máxima, sendo dessa forma, efetivo em melhorar o condicionamento físico de indivíduos obesos sedentários. Encontramos aumento médio do  $VO_{2max}$  de 12 e 9% nos grupos OB e OBR, respectivamente. A melhora do condicionamento físico é também reportada em diversos estudos realizados com obesos que utilizaram o HIIT como modalidade de treinamento (TSEKOURAS *et al.*, 2008; WALLMAN *et al.*, 2009; TJØNNA *et al.*, 2009; FISHER *et al.*, 2015). No estudo de Fisher *et al.* (2015) homens com sobrepeso e obesos submetidos a um protocolo de 6 semanas de HIIT apresentaram aumento do  $VO_{2pico}$  em 11,1%. Wallman *et al.* (2009) encontraram aumento de aproximadamente 17% do  $VO_{2pico}$  em indivíduos com sobrepeso e obesidade, após 8 semanas de HIIT. Um protocolo de HIIT com maior duração, 12 semanas, promoveu aumento de 15% do  $VO_{2pico}$  (HEYDARI, FREUND e BOUTCHER, 2012). Portanto, a melhora de  $VO_{2max}$  reportada no presente estudo foi similar a estudos anteriores que utilizaram protocolos de HIIT em indivíduos obesos.

Ao avaliarmos o efeito do HIIT sobre a composição corporal dos participantes do estudo não observamos diferença na massa corporal, IMC, CC e na quantidade de massa gorda. No entanto, houve aumento de massa magra no OBR, e redução do percentual de gordura corporal no OB, mas sem alteração na massa gorda. Possivelmente, essa redução do percentual de gordura está relacionada ao aumento de massa magra ( $p=0,06$ ). Ainda não há consenso na literatura sobre o efeito do HIIT na quantidade de gordura corporal. Keating *et al.* (2014) observaram que 12

semanas de HIIT não alteraram a composição corporal de mulheres e homens com excesso peso. Por outro lado, Heydari, Freund e Boutcher (2012) reportaram que um protocolo de 12 semanas promoveu reduções na gordura total, abdominal, do tronco e visceral e aumentou significativamente a massa livre de gordura. Uma justificativa para não observarmos a redução da quantidade de gordura corporal nos nossos voluntários foi o aumento da ingestão calórica dos participantes observada ao final do estudo (TABELA 6).

Nós também observamos que o HIIT não reduziu a quantidade de tecido adiposo visceral em ambos os grupos, mesmo no OBR, que apresentava uma quantidade maior em relação aos demais grupos. Na literatura também não há consenso sobre a redução do tecido adiposo visceral com o HIIT em indivíduos obesos ou com sobrepeso (SAWYER, 2013; HEYDARI, FREUND e BOUTCHER, 2012). O excesso de gordura corporal, particularmente a abdominal, é considerado fator de risco independente para resistência à insulina (FUJIOKA *et al.*, 1987) e para doenças cardiovasculares (NAKAMURA *et al.*, 1994). No presente estudo, os indivíduos obesos resistentes à insulina apresentaram melhora da sensibilidade à insulina independente de redução do tecido adiposo visceral. Isso indica, portanto, que o HIIT possivelmente reduz a resistência à insulina independentemente de alterações na quantidade de tecido adiposo visceral.

Após 8 semanas de HIIT encontramos redução da hiperinsulinemia e da resistência à insulina avaliada pelo índice HOMA-IR no OBR. Já para o grupo OB não observamos efeito significativo do HIIT sobre essas variáveis, embora, dos 9 voluntários do OB avaliados, 6 apresentaram menor HOMA-IR ao final do treinamento. Diversos estudos realizados com indivíduos obesos empregaram o HIIT como modalidade de treinamento e demonstraram efetividade na melhora da sensibilidade à insulina (HOOD *et al.*, 2011; WHYTE *et al.*, 2010). Corroborando com esses achados, uma meta-análise recente, concluiu que o HIIT é eficaz em melhorar a resistência à insulina (JELLEYMAN *et al.*, 2015). Esse, contudo, é o primeiro estudo que avaliou o efeito do HIIT em obesos resistentes e sensíveis à insulina.

Ao avaliarmos o efeito do HIIT sobre o TTOG, não observamos diferenças quanto à glicose ou insulina em 120 minutos (AUC). No estudo de Whyte *et al.* (2010) após 2 semanas de HIIT foi reportado redução da AUC para insulina 24 horas após a última sessão de exercício, mas não 72 horas depois. E para AUC para glicose não houve modificação. Little *et al.* (2011) observaram redução da AUC para glicose, após 2 semanas de HIIT, apenas 24 horas após a

última sessão de exercício. Em todos os estudos citados, os resultados foram referentes a coletas sanguíneas realizadas 24 horas após a última sessão de treinamento, o que pode refletir, dessa forma, o efeito agudo do exercício.

Considerando que o protocolo de treinamento adotado promoveu melhora da sensibilidade à insulina nos obesos resistentes à insulina, passamos a investigar o efeito do HIIT em componentes celulares e moleculares que poderiam estar envolvidos nessa resposta. Além de ser apontado como o foco inicial da inflamação, alguns estudos sugerem que o tecido adiposo é também a principal fonte de ROS na obesidade (FURUKAWA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2009). E o excesso de ROS estaria relacionado ao desenvolvimento de resistência à insulina (EVANS, MADDUX E GOLDFINE, 2005). Nós avaliamos o estresse oxidativo a partir da análise de marcadores de dano oxidativo (peroxidação lipídica) e da atividade de enzimas antioxidantes no sangue. Observamos maior concentração de TBARS nos eritrócitos nos grupos OB e OBR em relação ao CON e correlação dessa medida com índices de adiposidade (IMC e percentual de gordura). Em relação à atividade das enzimas antioxidantes não encontramos diferenças entre os grupos. Semelhantemente, outros estudos também demonstraram maior peroxidação lipídica em indivíduos obesos (TÜRKÖĞLU *et al.*, 2003; YESILBURSA *et al.*, 2005; OLUSI, 2012). Nossos achados juntamente com os da literatura demonstram, portanto, que o excesso de gordura está associado ao aumento do estresse oxidativo, independente da presença de resistência à insulina.

Nós posteriormente avaliamos se o HIIT modificaria os parâmetros de estresse oxidativo nos indivíduos obesos. Após 8 semanas de treinamento não encontramos alterações quanto às medidas de dano oxidativo ou atividade das enzimas antioxidantes. Ainda são poucos os estudos que avaliaram o efeito do HIIT sobre o estado redox sistêmico. Bogdanis *et al.* (2013) investigaram o efeito de 3 semanas de HIIT sobre biomarcadores do estado redox em homens saudáveis. Foram reportadas redução de marcadores de dano oxidativo (TBARS) e uma elevação acentuada dos índices de capacidade antioxidante (CAT, GPx e capacidade antioxidante total). No presente estudo, ao compararmos os grupos antes do treino encontramos aumento da concentração de TBARs nos obesos, independente da presença de resistência à insulina, e que esse marcador de peroxidação lipídica foi correlacionado com o percentual de gordura e IMC. Esses resultados nos levam a especular que o aumento do tecido adiposo nos obesos seja a fonte

da maior peroxidação lipídica, e como o HIIT não promoveu redução da gordura corporal, esse estímulo estressor ainda estaria presente.

A obesidade é caracterizada pela presença de uma inflamação crônica de baixo grau. A expansão do tecido é acompanhada por maior infiltração de células inflamatórias e liberação de citocinas que podem contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina (XU *et al.*, 2003; WEISBERG *et al.*, 2003). Considerando essas evidências, nós avaliamos a contagem e a frequência das diferentes subpopulações leucocitárias, e também a concentração de algumas citocinas circulantes. Ao compararmos os grupos experimentais, observamos maior número de linfócitos e maior frequência das células NKT no grupo OBR e maior frequência dos linfócitos B no grupo OB. Ao contrário de nossos achados, O'Rourke *et al.*, (2005) reportaram uma maior frequência de células TCD4<sup>+</sup> e redução na frequência de células TCD8<sup>+</sup>, ao se comparar indivíduos obesos mórbidos com controle eutróficos. Lynch *et al.*, (2009) observaram uma menor frequência de células T CD8<sup>+</sup> e NK em indivíduos obesos mórbidos, mas não encontraram diferença na frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B. Alam, Larbi e Pawelec (2012) não observaram diferenças significativas na frequência de linfócitos B e células NK ao compararem indivíduos obesos com eutróficos. Por outro lado, O'Shea *et al.* (2010) reportaram que obesos mórbidos apresentaram menor frequência de células NK, assim como uma função comprometida dessas células.

A partir dos achados desses estudos, percebemos que existe uma grande variação quanto ao efeito da obesidade sobre os linfócitos, contudo, existem fatores que podem explicar essas diferenças. Alguns dos trabalhos citados envolveram indivíduos com obesidade mórbida e indivíduos que apresentavam comorbidades associadas à obesidade (diabetes, apnéia do sono, hipertensão, osteoartrite, doença arterial coronariana e refluxo gastresofágico) e/ou faziam uso de medicamentos (hipoglicemiantes, anti-hipertensivos, antiinflamatórios, anticolesterolémico e hormônio da tireóide). Já os indivíduos que participaram do presente estudo não reportaram qualquer doença aguda ou crônica, assim como não utilizavam medicamentos e a maioria não foi classificada no estágio de obesidade mórbida (apenas 1 voluntário do OB e 2 do OBR). Isso sugere que as alterações relatadas nos estudos citados podem ser decorrentes não somente da obesidade em si, mas das doenças associadas. Esta hipótese é sustentada pelos achados de Lynch *et al.*, (2008) que demonstraram que a redução na frequência de células TCD8<sup>+</sup> foi maior nos

obesos não saudáveis metabolicamente comparados com o grupo de indivíduos obesos metabolicamente saudáveis.

Em relação às subpopulações de monócitos, observamos maior frequência dos monócitos não clássicos ( $CD14^+CD16^{++}$ ) nos grupos OB e OBR em relação ao controle. Para as demais subpopulações de monócitos não foram encontradas diferenças entre os grupos. Outros estudos também identificaram maior frequência de monócitos  $CD16^+$  em indivíduos obesos (ROGACEV *et al.*, 2010; POITOU *et al.*, 2011; KRINNINGER *et al.*, 2014; MATOS *et al.*, 2016). Os monócitos não clássicos ( $CD14^+CD16^{++}$ ) juntamente com os monócitos intermediários ( $CD14^{++}CD16^+$ ) constituem um subgrupo de monócitos,  $CD16^+$ . Essa subpopulação é geralmente denominada de monócitos inflamatórios em função da capacidade de produzir quantidades elevadas de  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$  (FRANKENBERGER *et al.*, 1996; BELGE *et al.*, 2002). Uma maior frequência das células  $CD16^+$  tem sido reportada em diferentes doenças, principalmente em infecções ou condições inflamatórias (FINGERLE *et al.*, 1993; KAWANAKA *et al.*, 2002; CASTANO *et al.*, 2011). Adicionalmente, no presente estudo observamos que a frequência dos monócitos não clássicos foi correlacionada positivamente com o IMC, o percentual de gordura corporal e TBARS nos eritrócitos. Dessa forma, acreditamos que o excesso de gordura e o estresse oxidativo possam, em parte, contribuir para a maior frequência dessas células na circulação, e que a presença de resistência à insulina não parece interferir ou ser explicada por essa alteração dos monócitos não clássicos.

Ao avaliarmos a concentração das citocinas  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$  e  $IL-10$  não observamos diferenças significativas entre os grupos. Similarmente, no estudo de Olszanecka-Glinianowicz *et al.* (2011) as concentrações de  $TNF-\alpha$ , assim como dos seus receptores solúveis, não foram diferentes entre obesos com ou sem síndrome metabólica comparados ao grupo de eutróficos. Embora diversos estudos reportem aumento da concentração de citocinas na obesidade e relacionam esse estado inflamatório com o desenvolvimento da resistência à insulina (LAURELL *et al.*, 2008; FEITOSA *et al.*, 2013; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995), mais recentemente algumas evidências contrárias foram reportadas. Ryder *et al.* (2014) ao compararem indivíduos obesos resistentes e sensíveis à insulina com eutróficos, observaram que as concentrações de  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$  foram maiores apenas nos obesos sensíveis à insulina. Segundo os autores, a maior concentração dessas citocinas não estava relacionada com a resistência à insulina, sugerindo que



possa existir um período no início da obesidade em que o efeito destas citocinas sobre a produção e sinalização da insulina esteja ausente. Corroborando com essa ideia, recentemente Amouzou *et al.* (2016) analisaram três grupos de indivíduos: obesos sensíveis à insulina, obesos resistentes à insulina e eutróficos. Os autores reportaram não haver diferença na concentração sistêmica de TNF- $\alpha$ , IL-4, MCP-1, IL-1 $\beta$  e interferon gama (IFN $\gamma$ ) entre os grupos. Já a concentração da IL-10 foi menor nos obesos resistentes à insulina comparados aos eutróficos, no entanto, não foi diferente dos obesos sensíveis à insulina. Além disso, observou-se similar expressão no músculo esquelético do mRNA do TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e MCP-1 entre os grupos. De acordo com os autores a resistência à insulina no músculo esquelético é um evento precoce na patogênese da resistência à insulina relacionada à obesidade, que se desenvolve antes de qualquer alteração na inflamação sistêmica e tecidual.

Nós, posteriormente, avaliamos se um programa de HIIT poderia alterar a frequência das subpopulações leucocitárias, assim como a concentração das citocinas. Após 8 semanas de HIIT não observamos alterações nas células imunes circulantes. Não identificamos na literatura estudos que avaliaram o efeito do HIIT sobre a frequência dessas células. Além disso, são poucos os estudos que avaliaram o efeito do treinamento aeróbio contínuo sobre esses parâmetros; a maioria dos estudos investigou as respostas das células imunes a uma única sessão de exercício.

Ao avaliarmos o efeito do HIIT sobre as concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 também não encontramos alterações. Outros estudos também não reportaram efeito do HIIT sobre as concentrações de citocinas. Foi demonstrado, por exemplo, que homens com sobrepeso e obesos submetidos a 2 semanas de HIIT não apresentaram alteração da concentração de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 (LEGGATE *et al.*, 2012). Ahmadizad *et al.* (2015) também observaram que 6 semanas de HIIT não alteraram as concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  em homens com sobrepeso. Além disso, Boyd *et al.* (2013) observaram que indivíduos com sobrepeso e obesos submetidos a 3 semanas de HIIT não apresentaram mudança nas concentrações plasmáticas de IL-6 ou TNF- $\alpha$  após o treinamento. Os autores sugeriram que a ausência de alterações poderia indicar que o controle da inflamação requeira um período de treinamento mais longo, ou que a população examinada no estudo não exibiu uma inflamação de baixo grau prévia. No presente estudo, a análise pré-treino dos voluntários também não identificou aumento da concentração das citocinas, o que pode ter contribuído para a ausência de efeito do HIIT sobre essas variáveis.

Uma vez que não encontramos mudanças significativas após o HIIT nos parâmetros sistêmicos avaliados, nós hipotetizamos que componentes moleculares no músculo esquelético podem ter sido modulados contribuindo para a melhora da sensibilidade à insulina. Dessa forma, analisamos alguns componentes da via de sinalização da insulina, proteínas relacionadas ao estresse celular e ao conteúdo e função mitocondriais.

Ao avaliarmos a fosforilação do IRS (Tyr612) e da Akt (Ser 473) no músculo esquelético não observamos diferença entre os grupos CON, OB e OBR. De forma semelhante, Stuart *et al.* (2014) não observaram diferença quanto a fosforilação do IRS (Tyr896) no estado basal (sem estímulo da insulina) em indivíduos obesos com síndrome metabólica. Kim *et al.* (1999) analisaram a fosforilação das isoformas da Akt em 3 grupos de indivíduos: eutróficos, obesos não diabéticos e obesos com DM2. Os autores reportaram que a atividade basal da Akt1/2 e da Akt3 foi semelhante em todos os grupos. No presente estudo, nós avaliamos a fosforilação dos componentes da via de sinalização da insulina sem o estímulo desse hormônio e dessa forma, não sabemos qual o comportamento da atividade dessas proteínas perante o estímulo da insulina nos diferentes grupos avaliados. Outro ponto a se considerar, é que a resistência à insulina pode ser resultado de alterações em qualquer etapa da via de sinalização desse hormônio, assim enquanto alguns componentes da via podem estar preservados, as alterações podem estar presentes em outras proteínas. No estudo de Kim *et al.* (1999), por exemplo, foi observado que os indivíduos com DM2 têm prejuízos a nível do IRS-1 e PI3K, mas não da Akt.

Já em relação a AS160 (Thr642), nós observamos menor fosforilação desse resíduo nos indivíduos obesos comparados ao controle. A AS160 é regulada pela fosforilação de vários resíduos de serina e treonina em resposta à insulina e à contração muscular. Atualmente, pelo menos dez locais de fosforilação foram identificados (KRAMER *et al.*, 2006; SAKAMOTO e HOLMAN, 2008). Dentre todos esses resíduos, a Thr642 e Ser588 parecem ser os resíduos-chave na regulação da translocação do GLUT4 mediada pela Akt em resposta à insulina (SANTO *et al.*, 2003). Similar aos nossos achados, outros estudos reportaram alteração da fosforilação da AS160 (Thr642) na presença de resistência à insulina. Consitt *et al.* (2013) observaram que em humanos a redução da ação da insulina foi associada com prejuízo no músculo esquelético da fosforilação induzida pela insulina da AS160 nos resíduos serina 588, treonina 642 e serina 666. A partir de análises de regressão, reportaram que o percentual de gordura corporal foi o melhor preditor para

a fosforilação da serina 588 e a concentração plasmática de insulina para a fosforilação da treonina 642, sugerindo a existência de regulações distintas para cada sítio.

Como revisado por Højlund *et al.* (2014), os estudos têm indicado que a presença de resistência à insulina é acompanhada por um prejuízo na ação do AS160. No presente estudo a menor fosforilação do AS160 (Thr642) foi encontrada em ambos os grupos de obesos, sensíveis e resistentes à insulina. O que poderia indicar que mesmo na ausência do diagnóstico clínico de resistência à insulina, a obesidade por si só, já ocasiona alterações na via de sinalização desse hormônio. Observamos, por exemplo, que o HOMA- $\beta$  do grupo OB foi diferente do CON e, embora o HOMA-IR não tenha sido diferente entre os grupos, o valor médio desse índice foi praticamente o dobro comparado ao CON. Possivelmente, devem existir diferenças em termos da sinalização ao se comparar indivíduos obesos sensíveis e resistentes à insulina, contudo, acreditamos que essas diferenças devem se tornar evidentes na presença do estímulo da insulina.

Nesse estudo, após 8 semanas de HIIT houve melhora da sensibilidade à insulina nos obesos resistentes à insulina. Dessa forma, nós investigamos se esse efeito poderia estar relacionado a modulações do HIIT sobre componentes da via de sinalização da insulina no músculo esquelético. Com o treinamento, observamos maior fosforilação do IRS (Tyr612) e da Akt (Ser473) em ambos os grupos. Contudo, não houve efeito sobre a fosforilação do AS160 (Thr642) e o conteúdo de GLUT 4. Investigações sobre o efeito do HIIT em componentes da via de sinalização da insulina no músculo esquelético são escassas, principalmente em indivíduos obesos. Marcinko *et al.* (2015) em estudo realizado com ratos, observaram que 6 semanas de HIIT promoveram no músculo esquelético maior fosforilação da Akt (Ser473 e Thr308), mas não houve alteração do AS160 (Thr642). Resultados esses, semelhantes aos encontrados no nosso estudo. Já Tjønnha *et al.* (2008) reportaram que indivíduos com síndrome metabólica apresentaram no músculo esquelético aumento da fosforilação da tirosina do receptor de insulina após 16 semanas de HIIT. Outros estudos reportaram aumento do conteúdo de GLUT4 após diferentes protocolos de HIIT (BURGOMASTER *et al.*, 2007; LITTLE *et al.*, 2010). Nossos resultados em conjunto com os já descritos na literatura apontam para um efeito do HIIT em modular benéficamente componentes da via de sinalização da insulina no músculo esquelético.

Estudos realizados em *in vivo* e *in vitro* reportam uma associação entre as diferentes MAPKs, obesidade e resistência à insulina (CARLSON *et al.*, 2003; BOUZAKRI *et al.*, 2003;

JHENG *et al.* 2013). A ação dessas proteínas é necessária para processos fisiológicos normais, contudo, a sinalização inadequada pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (GERART *et al.*, 2010). Ao compararmos os grupos, não houve diferença da fosforilação da JNK1/2 e da ERK1/2. Já em relação à p38, observamos maior fosforilação dessa proteína no OBR. No estudo de Alvaro *et al.*, (2004) foi observado que em miotubos de ratos o TNF- $\alpha$ , através da ativação da p38, produz fosforilação de resíduos de serina do IR e do IRS-1, comprometendo a fosforilação da tirosina pela insulina e a ativação correspondente da PI3K e da Akt, conduzindo à resistência à insulina. Os mecanismos responsáveis pela maior ativação da p38 no quadro de resistência à insulina não são totalmente compreendidos. Estudos demonstram que fatores como a adenosina monofosfato cíclico (AMPc), estresse oxidativo e citocinas podem ativar essa MAPK (KAESTNER *et al.*, 2001; PESSLER, RUDICH e BASHAN, 2001). Nossos achados demonstram, portanto, que a p38 parece estar relacionada à resistência à insulina no músculo esquelético de obesos, tornando-se um alvo interessante para futuras investigações.

Considerando as evidências da participação das MAPKs no desenvolvimento da resistência à insulina, nós investigamos se houve modulação dessas proteínas pelo HIIT. Não observamos diferenças significativas na fosforilação da JNK1/2 e da p38 após o treinamento. Contudo, houve redução da fosforilação ERK1/2 no grupo OBR. A inibição da via de sinalização da ERK é relacionada ao aumento da fosforilação da Akt e reversão da resistência à insulina induzida pelo estresse do RE em miotubos L6 (HWANG *et al.*, 2013). Assim, o aumento da sensibilidade à insulina observado no OBR pode estar relacionado à menor fosforilação da ERK1/2 nesse grupo. Contudo, não sabemos se o programa de treinamento adotado atuaria diretamente sobre essa MAPK, ou se o efeito seria por meio de alterações em outros componentes, como a redução do estresse celular ou inflamação no músculo esquelético, parâmetros não avaliados no presente estudo.

É importante considerar, que os estudos geralmente focam em investigar o efeito agudo do exercício sobre as MAPKs (LONG *et al.*, 2004; PEDERSEN e FEBBRAIO, 2012; WRETMAN *et al.*, 2001). O que é justificável ao considerar-se que as adaptações dos diversos sistemas fisiológicos ao treinamento físico decorrem do somatório das alterações promovidas por cada sessão de exercício individual. Como descrito por Benzi *et al.* (2008) uma única sessão de exercício pode promover alterações intracelulares transitórias, que são observadas apenas

momentaneamente, e que são responsáveis por desencadear as alterações celulares envolvidas com a adaptação do organismo como um todo ao exercício crônico. Dessa forma, destaca-se a importância da realização de estudos que possam investigar tanto o efeito agudo quanto o crônico do exercício intervalado de alta intensidade na tentativa de elucidar se há ou não de fato a participação dessas vias nas adaptações metabólicas após o treinamento em indivíduos obesos.

Nossos resultados nos levam a pensar sobre a participação de outras vias moleculares na melhora da sensibilidade à insulina promovida pelo HIIT. Estudos recentes apontam para o papel da Hsp72 em modular a resistência à insulina no contexto da obesidade (HENSTRIDGE *et al.*, 2014; DREW *et al.*, 2014). Dessa forma, inicialmente comparamos o conteúdo da Hsp72 no músculo esquelético dos grupos experimentais e não observamos diferenças significativas. No estudo de Chung *et al.* (2008) foi reportado que obesos resistentes à insulina, comparados a eutróficos, apresentaram menor conteúdo muscular da Hsp72. Em um estudo prévio, observamos menor expressão da Hsp72/73 em indivíduos obesos e essa redução foi maior na presença de resistência à insulina (MATOS *et al.*, 2014). No presente estudo, não é possível relacionar o conteúdo dessa proteína com a obesidade e resistência à insulina.

Embora vários estudos demonstrem que o exercício físico funciona como estímulo para indução da Hsp72 (DESPLANCHES *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; MILNE e NOBLE, 2002), não observamos diferenças quanto ao conteúdo dessa proteína no músculo esquelético de obesos que foram submetidos a um programa de HIIT de 8 semanas. Morton *et al.* (2009) avaliaram no músculo esquelético de homens e mulheres saudáveis o efeito de dois programas de treinamento aeróbico durante 6 semanas. Os programas de treinamento consistiram em treinamento intervalado (6x4 minutos exercício a uma velocidade de corrida correspondente a 50%  $VO_{2max}$ , intercaladas com 1 min de exercício a uma velocidade correspondente à 100%  $VO_{2max}$ ) e treinamento contínuo (velocidade de corrida à 70%  $VO_{2max}$ , entre 26 -32 minutos). Os autores não observaram diferença quanto ao conteúdo da Hsp70 após os dois protocolos, e essa resposta foi semelhante entre homens e mulheres.

Considerando as evidências da literatura quanto à associação de alterações mitocondriais com o desenvolvimento da resistência à insulina, nós também avaliamos alguns componentes relacionados à biogênese mitocondrial e ao metabolismo oxidativo no músculo esquelético. Ao avaliarmos o conteúdo do PGC1- $\alpha$ , TFAM,  $\beta$ -HAD, COX-IV e fosforilação da CAMKII não

observamos diferenças entre os grupos. Dados similares são encontrados na literatura. Samjoo *et al.* (2013), ao compararem indivíduos obesos e eutróficos, não encontraram diferença no conteúdo muscular do PGC-1 $\alpha$ . O teor proteico da CS, COX-II e COX-IV, bem como as atividades máximas de CS, COX, e  $\beta$ -HAD também foram semelhantes entre homens magros e obesos. Outros estudos ao também compararem indivíduos obesos com eutróficos relataram que a obesidade não alterou o conteúdo proteico no músculo esquelético do PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$ , PPAR $\alpha$  ou TFAM (HOLLOWAY *et al.*, 2008; HOLLOWAY, BONEN e SPRIET, 2009). Por outro lado, Holloway *et al.* (2007) observaram que mulheres obesas apresentavam menor atividade da  $\beta$ -HAD, da citrato sintase e menor conteúdo de COX-IV.

Como revisado por Bakar *et al.* (2015), os dados disponíveis na literatura sobre a participação de genes e proteínas mitocondriais no desenvolvimento de resistência à insulina ainda são divergentes. O estudo de Holloway *et al.* (2008), por exemplo, revelou que a redução do conteúdo de proteínas mitocondriais de fatores de transcrição, incluindo PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$ , e proteínas associadas com a fusão mitocondrial do músculo esquelético não estão correlacionados com a progressão da resistência à insulina e obesidade. Destacando dessa forma, a necessidade de novas investigações para elucidar e compreender esses mecanismos.

O que podemos especular de acordo com os mecanismos descritos na literatura e nossos achados é que o conteúdo mitocondrial nos obesos, independente da resistência à insulina, parece estar preservado e que talvez o maior fornecimento de lipídios para o músculo esquelético não é equilibrado por um aumento do metabolismo oxidativo, o que permite acúmulo de metabolitos lipídicos e geração de estresse oxidativo que interferem com a sinalização da insulina. Dessa forma, se o aumento do metabolismo lipídico fosse de alguma forma aprimorado, quer seja pela biogênese mitocondrial ou aumento da capacidade oxidativa, poderia ocorrer o equilíbrio entre a quantidade de substratos lipídicos e sua metabolização. Assim, nós avaliamos se o HIIT poderia atuar nesse sentido.

Após 8 semanas de HIIT observamos no músculo esquelético dos obesos aumento da fosforilação da CAMKII e maior conteúdo da COX-IV e  $\beta$ -HAD, mas não identificamos alterações no conteúdo do PGC-1 $\alpha$  ou do TFAM. No estudo de Rose *et al.* (2007) jovens saudáveis completaram 3 semanas de treinamento de *endurance*, sendo observado aumento da fosforilação da CAMKII (Thr287). Não identificamos na literatura estudos que avaliaram o efeito

do HIIT sobre a CAMKII, mas seu papel na adaptação muscular ao treinamento físico já é descrito (HAWLEY *et al.*, 2006; CHIN, 2004). Sabe-se que a CAMKII juntamente com a AMPK, p38 e ROS são alguns dos estímulos para indução do PGC-1 $\alpha$ . Zhang *et al.* (2014), a partir de estudos *in vitro*, sugeriram que em células musculares durante o repouso a p38, AMPK, ou ROS não contribuem para os níveis basais de atividade do promotor do PGC-1 $\alpha$ . Em contraste, a redução de níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular no músculo em repouso atenuou significativamente a atividade do promotor. Estes resultados indicam que os níveis basais de transcrição do PGC-1 $\alpha$  são mais sensíveis aos níveis de repouso de Ca<sup>2+</sup>, em comparação com as ROS, p38 ou da sinalização AMPK. Além disso, verificou-se que a ativação das moléculas de sinalização de AMPK, ROS, e Ca<sup>2+</sup> é necessária para a regulação da expressão do gene PGC-1 $\alpha$  induzida pela atividade contrátil, regulada, em parte, através das vias da p38 e CAMKII.

No estudo Boyd *et al.* (2013) foi observado que indivíduos com sobrepeso e obesos submetidos a 3 semanas de HIIT apresentaram aumento da capacidade oxidativa muscular, caracterizada pelo aumento do conteúdo da COX-I e IV e aumento da atividade da CS. Houve ainda aumento do conteúdo de PGC-1 $\alpha$  e SIRT1. Já Granata *et al.* (2016) reportaram que homens saudáveis submetidos a 4 semanas de HIIT não apresentaram modificação no conteúdo proteico do PGC-1 $\alpha$  e do TFAM no músculo esquelético.

No estudo de Little *et al.* (2010) foi observado que 2 semanas de HIIT promoveram em homens saudáveis aumento da atividade da CS, e do conteúdo das subunidades II e IV da citocromo C oxidase e de TFAM. O conteúdo nuclear do PGC-1 $\alpha$  foi aumentado, mas sem alteração no conteúdo total. Os achados desse estudo ressaltam a importância de considerarmos as diferenças na mensuração do PGC-1 $\alpha$  nuclear ou total. De acordo com alguns autores, o conteúdo de proteína total do PGC-1 $\alpha$  pode não ser totalmente indicativo da sua ativação, uma vez que, a atividade do PGC-1 $\alpha$  é determinada principalmente pela sua localização subcelular (WRIGHT *et al.*, 2007; COWELL *et al.*, 2007) e várias modificações pós-traducionais (JAGER *et al.*, 2007; CANTO *et al.*, 2009).

A  $\beta$ -oxidação é o processo mitocondrial mais importante no catabolismo de ácidos graxos para a produção de energia nas mitocôndrias. Um conceito de ciclo incompleto de  $\beta$ -oxidação foi introduzido para caracterizar a condição de excesso de lipídios, o que aumenta a oxidação dos ácidos graxos sem a ativação do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia transportadora de

elétrons (ADAMS *et al.*, 2009). Isso promove o acúmulo anormal de intermediários lipídicos, tais como a acilcarnitina, na membrana mitocondrial e exerce os seus efeitos nocivos em várias atividades metabólicas das mitocôndrias. Nossos dados demonstram que o HIIT promoveu aumento do conteúdo da  $\beta$ -HAD e COX-IV, o que indica um aprimoramento do metabolismo oxidativo e, talvez isso possa ter contribuído para a melhora da sinalização da insulina.

Perry *et al.* (2010) examinaram o tempo de curso de alguns potenciais fatores de transcrição, translação e morfológicos que estão envolvidos na biogênese mitocondrial durante o treinamento físico no músculo esquelético humano durante 2 semanas de HIIT. Biópsias musculares foram obtidas 4 e 24 horas após a primeira, terceira, quinta e sétima sessão de treinamento. O conteúdo proteico do PGC-1 $\alpha$  aumentou 24 h após a primeira sessão (23%) e estabilizou-se em 30-40% entre as sessões 3 e 7. A expressão do mRNA da CS e  $\beta$ -HAD foram rapidamente aumentados (1 sessão), seguido 2 sessões mais tarde (sessão 3), por aumentos nas atividades dessas enzimas. Mudanças na expressão do mRNA (sessão 3) e conteúdo proteico da COX-IV (sessão 5) foram mais lentas. Já para o Tfam não foram observadas diferenças. Os autores reportaram que a resposta do mRNA ao exercício foi atenuada com o músculo adaptado, mesmo que a intensidade de treinamento fosse aumentada. Os autores sugeriram, portanto, que há uma complexidade na regulação da transcrição gênica de componentes da biogênese mitocondrial induzida pelo exercício. Isso nos leva a acreditar que a ausência de diferenças, como por exemplo, no conteúdo do PGC-1 $\alpha$  após 8 semanas de treinamento não necessariamente reflete a não modulação pelo HIIT, mas que a adaptação possa ter ocorrido previamente às nossas análises.

Nossos dados demonstram que um programa de HIIT durante 8 semanas promoveu melhora da sensibilidade à insulina em indivíduos obesos resistentes à insulina. Assim, avaliamos parâmetros sistêmicos e no músculo esquelético envolvidos nos mecanismos propostos para o desenvolvimento da resistência à insulina associada à obesidade (FIGURA 16A). Embora parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo sejam relacionados ao desenvolvimento da resistência à insulina, no presente estudo esses parâmetros, a nível sistêmico, não foram alterados. Observamos melhora na ativação de componentes da via de sinalização da insulina e aumento no conteúdo de proteínas que participam das vias do metabolismo oxidativo (FIGURA 16B). Esses achados nos levam a hipotetizar que o aumento do metabolismo lipídico possa ter contribuído



para a oxidação de intermediários lipídicos acumulados no músculo esquelético e consequentemente na melhora da sinalização da via da insulina. Ressalta-se a importância da realização de novos estudos que possam investigar se realmente modulação nas vias mitocondriais é o mecanismo chave para a melhora da resistência à insulina relacionada à obesidade promovida pelo HIIT.

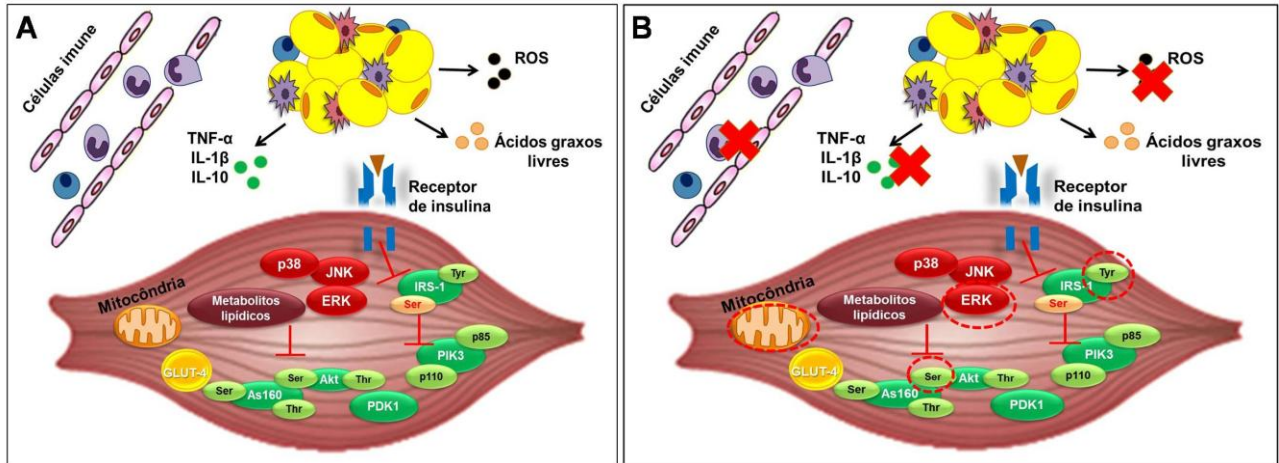


Figura 16- (A) Mecanismos propostos para o desenvolvimento da resistência à insulina associada à obesidade. Existem duas teorias principais para explicar o desenvolvimento da resistência insulina relacionada à obesidade. Uma delas considera que a obesidade é caracterizada por uma inflamação crônica de baixo grau; esse modelo defende que há expansão do tecido adiposo e maior infiltração de células do sistema imunológico nesse tecido com consequente maior produção de citocinas pró-inflamatórias que podem atuar no músculo. O segundo modelo defende a teoria de lipotoxicidade em que o maior fluxo de substratos lipídicos para o músculo esquelético promove acúmulo de metabolitos lipídicos. Ambos os mecanismos envolvem a participação de MAPKs que inibem a via de sinalização da insulina, resultando na resistência à insulina. (B) Efeito de 8 semanas de HIIT em componentes celulares e moleculares relacionados à resistência à insulina em indivíduos obesos. O HIIT não modificou a concentração de citocinas circulantes, frequência de células imunes ou parâmetros de estresse oxidativo sistêmicos. Contudo, promoveu aumento da fosforilação das proteínas IRS-1 e Akt, redução da fosforilação da ERK1/2 e aumento do conteúdo da  $\beta$ -HAD e COX-IV. Fonte: ilustração da autora.

É importante ressaltar que outros fatores não analisados no presente estudo podem ter contribuído para o aumento da sensibilidade à insulina após o treinamento. Nós observamos, por exemplo, que após o treinamento houve aumento da massa magra no OBR. A maior superfície celular, por si só, poderia facilitar a ação da insulina. Alguns estudos reportam, por exemplo, uma relação entre a densidade capilar muscular e a captação periférica da glicose mediada pela

insulina (SOLOMON *et al.*, 2011; GAVIN *et al.*, 2005). Embora não tenhamos medido qualquer fator relacionado à capilaridade muscular, um aumento da mesma, poderia contribuir diretamente para a melhora da sensibilidade à insulina.

O presente estudo apresentou algumas limitações que devem ser consideradas. Não incluímos no estudo um grupo de obesos que não foi submetido ao programa de treinamento (controle), assim, não sabemos se as mudanças encontradas foram exclusivamente devido ao HIIT. Após o programa de treinamento não observamos diferença significativa no índice de sensibilidade muscular à insulina, mas observamos mudança no HOMA-IR. Esse índice é um modelo matemático que se baseia no equilíbrio entre as concentrações plasmáticas de insulina e glicose no estado de jejum. E dessa forma reflete o balanço entre a produção hepática de glicose e a secreção de insulina, que é mantido por uma retro-alimentação entre as células hepáticas e as células beta do pâncreas (TURNER *et al.*, 1979). Contudo, em várias condições que são caracterizadas pela resistência a insulina periférica, a resistência à insulina hepática é também evidente (De FRONZO *et al.*, 1991; BONORA *et al.*, 1992; Del PRATO *et al.*, 1993). Vários estudos que investigaram a utilização do índice HOMA1-IR reportaram ser esse teste um bom preditor da sensibilidade periférica à insulina (EMOTO *et al.*, 1999; BONORA *et al.*, 2000). De acordo com Wallace *et al.* (2004) o índice HOMA já se tornou uma medida utilizada em diversos estudos clínicos e epidemiológicos para avaliação da resistência a insulina, sendo citado em mais de 500 publicações.

Nós avaliamos a fosforilação de componentes da via de sinalização da insulina no estado basal, sem o estímulo da insulina. Acreditamos que as alterações poderiam ser mais evidentes ao avaliarmos a resposta desses componentes após o estímulo da insulina. A maioria dos estudos avaliam a fosforilação de componentes da via de sinalização da insulina após o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico. Contudo esse teste possui algumas desvantagens que impossibilitaram a realização do mesmo, como o alto custo, necessidade de equipamentos como bombas de infusão e aparelho de análise instantânea de glicose, bem como a necessidade de pessoal altamente especializado e treinado para sua execução (BONORA *et al.*, 2000). Contudo, o fato de observarmos as alterações proteicas no músculo esquelético na ausência da ação da insulina é um achado interessante, pois vai de encontro com as mudanças sistêmicas relacionadas

ao controle glicêmico. Não observamos, por exemplo, alterações no TTOG, mas encontramos mudanças significativas da insulina de jejum.

No presente estudo não fizemos o acompanhamento do gasto energético por outras atividades físicas além do treinamento proposto. Apenas solicitamos aos voluntários que não realizassem outros treinamentos que envolvessem atividade física. Dessa forma, não sabemos a influência que essas atividades não controladas, até mesmo atividades da vida diária, possam ter nos parâmetros avaliados. Os voluntários incluídos no estudo, por exemplo, faziam o deslocamento para o local de treinamento a pé e geralmente fazem esse tipo de deslocamento no dia a dia.

Por fim, a nossa amostra foi composta por indivíduos de ambos os sexos e não sabemos se esse fato pode ter aumentado a variabilidade das análises. Outros estudos também utilizaram amostras mistas para avaliar as adaptações promovidas pelo HIIT (BURGOMASTER *et al.*, 2007; GILLEN *et al.*, 2014). No estudo Gillen *et al.* (2014), por exemplo, homens e mulheres com sobrepeso/obesidade foram submetidos a um programa de HIIT durante 6 semanas. Não foi observada influência do sexo na resposta ao treinamento para qualquer um dos resultados obtidos. As poucas evidências quanto diferenças adaptativas ao treinamento intervalado são reportadas por estudos que utilizaram o treinamento intervalado de *sprint* como modalidade de treinamento (SCALZO *et al.*, 2014; METCALFE *et al.*, 2011), o que não é o caso do presente estudo.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que 8 semanas de treinamento intervalado de alta intensidade promoveram melhora da sensibilidade à insulina em indivíduos obesos resistentes à insulina, o que foi acompanhada por maior ativação da via de sinalização desse hormônio no músculo esquelético. Essa resposta ocorreu independente de mudanças na quantidade de gordura corporal, e de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo sistêmicos. Acreditamos dessa forma, que o aumento do conteúdo de proteínas da via do metabolismo oxidativo no músculo esquelético possa ter contribuído com a melhora da sensibilidade à insulina após o treinamento.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-GHANI, M.A., et al. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. Diabetes Care, v.30, n.1, p.89-94, 2007.

ADAMS, S.H.; et al. Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. J Nutr, v.139, p.1073–1081, 2009.

AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol, v.3, n.9, p.745-56, 2003.

AGUIRRE, V., et al. Phosphorylation of Ser(307) in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. J Biol Chem, v.277, p.1531-1537, 2002.

AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. The Journal of Biological Chemistry, v.275, n.12, p.9047-9054, 2004.

AHMADIZAD, S., et al. The effects of short-term high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on plasma levels of nesfatin-1 and inflammatory markers. Horm Mol Biol Clin Investig, v.21, n.3, p.165-73, 2015.

ALAM, I; LARBI, A; PAWELEC, G. Nutritional status influences peripheral immune cell phenotypes in healthy men in rural Pakistan. Immun Ageing, v. 9, p.16, 2012.

ALVARO, C., et al. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. J Biol Chem, v.279, n.17, p.17070-8, 2004.

AMOUZOU, C., et al. Skeletal muscle insulin resistance and absence of inflammation characterize insulin-resistant grade I obese women. Plos One, v.11, n.4, 2016.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.

ANTUNA-PUENTE, B. *et al.* Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. Diabetes Metab, v.34, p.2–11. 2008.

ARCHULETA, T.L., *et al.* Oxidant stress induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: role of p38 MAPK. Free Radic Biol Med, v.47, p.1486–1493, 2009.

ARON-WISNEWSKY, J. *et al.* Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. J Clin Endocrinol Metab, v. 94, p. 4619–4623, 2009.

ASTORINO T.A., *et al.* Effect of two doses of interval training on maximal fat oxidation in sedentary women. Med Sci Sports Exerc, v.45, p.1878-1886, 2013.

AUSTIN, R.L., *et al.* siRNA-mediated reduction of inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase prevents tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in human skeletal muscle. Diabetes, v.57, p.2066–2073, 2008.

AVIGDOR, D. *et al.* High-intensity interval training without weight loss improves exercise but not basal or insulin-induced metabolism in overweight/obese African American women. J Appl Physiol, v.119, p.352–362, 2015.

BAAR, K., *et al.* Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. FASEB J, v.14, p. 1879–1886, 2002.

BABRAJ, J.A., *et al.* Extremely short duration high intensity interval training substantially improves insulin action in young healthy males. BMC Endocr Disord, v.9, p. 3, 2009.

BAKAR, M.H.A., *et al.* Mitochondrial dysfunction as a central event for mechanisms underlying insulin resistance: the roles of long chain fatty acids. Diabetes Metab Res Rev, v.31, n.5, p.453-75, 2015.

BANDYOPADHYAY G.K., et al. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. Diabetes, v.54, p.2351–2359, 2005.

BEAUCHAMP, M.K., et al. Interval versus continuous training in individuals with chronic obstructive pulmonary disease-a systematic review. Thorax, v.65, p.157-64. 2010.

BECKER, R., et al. Insulin resistance in patients with the mitochondrial tRNA (Leu(UUR)) gene mutation at position 3243. Exp Clin Endocrinol Diabetes, v.110, p. 291–297.

BELGE, K.U. et al. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. J Immunol, v.168, p.3536–42, 2002.

BENZIANE, B., et al. Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.295, n.6, E1427-38, 2008.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry, v.239, p.70-76, 1996.

BLACKBURN, G. Effect of degree of weight loss on health benefits. Obes Res, Suppl 2:211s-216s, 1995.

BLAIR, A.S., et al: Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress: evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. J Biol Chem, v.274, p.36293-36299, 1999.

BOGARDUS, C., et al..Effect of muscle glycogen depletion on in vivo insulin action in man. J Clin Invest, v.72, p.1605–1610, 1983.

BOGDANIS, G.C., et al. Short-term high intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. Food Chem Toxicol, v.61, p.71-7, 2013.

BONNARD, C., et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. The Journal of Clinical Investigation, v.118, n.2, p. 789-800, 2008.

BONORA, E., et al. Homeostasis Model Assessment Closely Mirrors the Glucose Clamp Technique in the Assessment of Insulin Sensitivity-Studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. Diabetes Care, v. 23, p.57–63, 2000.

BOST, F., et al. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for *in vitro* and *in vivo* adipogenesis. Diabetes, v.54, p.402–411, 2005.

BOUSHEL, R., et al. Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. Diabetologia, v.50, p.790–796, 2007.

BOUZAKRI, K., ZIERATH, J.R. MAP4K4 gene silencing in human skeletal muscle prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance. J Biol Chem, v.282, p.7783-7789, 2007.

BOUZAKRI, K., et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. Diabetes, v.52, n.6, p.1319-25, 2003.

BOYD, J.C., et al. Reducing the intensity and volume of interval training diminishes cardiovascular adaptation but not mitochondrial biogenesis in overweight/obese men. PLoS One, v.8, n.7, e6809, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal Biochemistry, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Tabnet – Tabulador de dados do SUS. Produção ambulatorial e procedimentos hospitalares do SUS. Disponível: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sia/cnv/qauf.def>. 2011.



BREHM, A., et al. Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. Diabetes, v. 55, p.136-140, 2006.

BRIGITTE, I., et al. Increased Adipose Protein Carbonylation in Human Obesity. Obesity, v.19, p.1735–1741, 2011.

BROWN, A.E., et al. p38 MAPK activation upregulates pro-inflammatory pathways in skeletal 2 muscle cells from insulin resistant type 2 diabetic patients. Am J Physiol Endocrinol Metab, v. 308, n. 1, E63-70, 2014.

BRUCE, C.R. et al. Intramuscular Heat Shock Protein 72 and Heme Oxygenase-1 mRNA Are Reduced in Patients With Type 2 Diabetes: Evidence That Insulin Resistance Is Associated With a Disturbed Antioxidant Defense Mechanism. Diabetes, v.52, p.2338–2345, 2003.

BURGOMASTER KA, HEIGENHAUSER GJ, GIBALA MJ: Effect of short-term sprint interval training on human skeletal muscle carbohydrate metabolism during exercise and time-trial performance. J Appl Physiol, v. 100, p. 2041– 2047, 2006.

BURGOMASTER, K.A., et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. J Physiol, v.586, p.151-160, 2008.

BURGOMASTER, K.A., et al. Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. J Appl Physiol, v.98, p. 1985–1990, 2005.

CABRERA, E.J. et al. Reduction in Plasma Levels of Inflammatory and Oxidative Stress Indicators After Roux-En-Y Gastric Bypass . Obes Surg, v.20, p. 42–49, 2010.

CALDERWOOD, S. K., MAMBULA, S. S. e GRAY, P. J., Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. Ann N Y Acad Sci, v. 1113, p. 28–39, 2007.

CANCELLO, R. et al: Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. Diabetes, v.54, p.2277–2286, 2005.

CARLSON, C.J; RONDINONE, C.M.Pharmacological inhibition of p38 MAP kinase results in improved glucose uptake in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. Metabolism, v.54, n.7, p.895-901, 2005.

CASTAN-LAURELL, I., et al. Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. Eur J Endocrinol, v.158, n.6, p.905-10, 2008.

CASTANO, D; GARCIA, L.F; ROJAS, M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. Tuberculosis, v.91, p.348–60. 2011.

CEFALU, W.T. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. ExpBiol Med, v.226, n.1, p.13-26, 2001.

CHANG, L., AND KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature, v.410, p.37-40, 2001.

CHANSEAUME, E., et al. Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type specific adaptations in mitochondrial functions in rats. J Nutr, v.136, p.2194-2200, 2006.

CHAVEZ J.A., et al.: Acid ceramidas overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. J Biol Chem, v.280, p.20148-20153, 2005.

CHAVEZ, J.A., SUMMERS, S. A ceramide-centric view of insulin resistance. Cell Metab, v.15, p.585–594, 2012.

CHAVEZ, J.A., SUMMERS, S.A. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. Arch Biochem Biophys, v.419, p.101-109. 2003.

CHEESEMAN K.H; SLATER T.F. An introduction to free radicals chemistry. Br Med Bull, v. 49 p.481-93, 1993.

CHEN, H. Cellular inflammatory responses: Novel insights for obesity and insulin resistance. Pharmacological Research, v. 53, p.469–477, 2006.

CHIBALIN, A.V., et al. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. Proc Natl Acad Sci USA, v.97, p.38–43. 2000.

CHIN, E.R. The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis. Proc Nutr Soc, v.63, 279-286, 2004.

CHRISTENSEN EH, HEDMAN R, SALTIN B. Intermittent and continuous running. Acta Physiol Scand, v.50, p.269-86, 1960.

CHRISTIAN, J., et al. Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes potential role of p38 in the downregulation of glut4 expression. Diabetes, v.52, p.634–641, 2003.

CHRIST-ROBERTS, C.Y., et al. Increased insulin receptor signaling and glycogen synthase activity contribute to the synergistic effect of exercise on insulin action. J Appl Physiol, v. 95, p.2519-2529, 2003.

CHUNG, J. et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. PNAS, v.105, n.5, p.1739–1744, 2008.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. J Lipid Res, v.46, n.11, p.2347-55, 2005.

COEN, P.M., et al. Reduced skeletal muscle oxidative capacity and elevated ceramide but not diacylglycerol content in severe obesity. Obesity, v.21, n.11, p.2362-71, 2013.

COFFEY, V.G.; HAWLEY, J.A. The molecular bases of training adaptation. Sports Med, v.37, p. 737-763, 2007.

COLDITZ, G.A., et al. Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. Am J Epidemiol, v.132, p.501–513, 1990.

COLL, T., et al. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. Diabetes, v.55, p.2779-2787, 2006.

CONSITT, L.A., et al. Impairments in site-specific AS160 phosphorylation and effects of exercise training. Diabetes, v.62, .10, p.3437-47, 2013.

COPPS, K.D., WHITE, M.F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. Diabetologia, v.55, n.10, p.2565-82, 2012.

COWELL, R.M., BLAKE, K.R; RUSSELL, J.W. Localization of the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  to GABAergic neurons during maturation of the rat brain. J Comp Neurol, v.502, p.1–18, 2007.

CUENDA A, ROUSSEAU S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim Biophys Acta, v.1773, p.1358–75, 2007.

DANDONA, P. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in sera of obese patients: fall with weight loss. J Clin Endocrinol Metab, v. 83, p.2907–2910, 1998.

DE FRONZO, R.A. et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: results from direct and indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. Diabetes, v.30, p.1000–1007, 1981.

De FRONZO, R.A; FERRANNINI, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care, v.14, p.173-194, 1991.

De FILIPPO, G. Interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex and insulin resistance in obese children and adolescents. Journal of Endocrinological Investigation, v.38, n.3, p. 339-343, 2015.

DeFURIA, J., et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T cell function and an inflammatory cytokine profile. Proc Natl Acad Sci U S A, v.110, n.13, p.5133-8, 2013.

De MATOS, M. A., et al. The effect of insulin resistance and exercise on the percentage of CD16<sup>+</sup> monocyte subset in obese individuals. Cell Biochem Funct, v.34, p.209-216, 2016.

DEL PRATO, S., et al. Characterization of cellular defects of insulin action in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. J Clin Invest, v.9, p.1:484–494, 1993.

DESCO, M.C., et al. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. Diabetes, v.51, p.1118-1124, 2002.

DESPLANCHES, D., et al. Skeletal muscle HSP72 response to mechanical unloading: influence of endurance training. Acta Physiologica Scandinavica, v.180, n.4, p.387-394, 2004.

DEVRIES, M.C., et al. Endurance training modulates intramyocellular lipid compartmentalization and morphology in skeletal muscle of lean and obese women. J Clin Endocrinol Metab, v.98, n.12, p. 4852-62, 2013.

DOKKEN, B.B., et al. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.294, E615–621, 2008.

DREW, B.G., et al. HSP72 is a mitochondrial stress sensor critical for Parkin action, oxidative metabolism, and insulin sensitivity in skeletal muscle. Diabetes, v.63, n.5, p.1488-505, 2014.

DUNCAN, J.G., et al. Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ /PGC-1 $\alpha$  gene regulatory pathway. Circulation, v.115, p.909 -917, 2007.

EARNEST, C.P., et al. Interval training in men at risk for insulin resistance. Int J Sports Med, v.34, n.4, p355-63, 2013.

EGAWA, K., et al. Persistent activation of phosphatidylinositol 3-kinase causes insulin resistance due to accelerated insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation in 3T3–L1 adipocytes. Endocrinology, p.141, p.1930 -1935, 2000.

EMOTO, M., et al. Homeostasis Model Assessment as a Clinical Index of Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients Treated With Sulfonylureas. Diabetes Care, v.22, p. 818–822, 1999.

ENGELMAN, J.A., et al: Tumor necrosis factor--mediated insulin resistance, but not dedifferentiation, is abrogated by MEK1/2 inhibitors in 3T3–L1 adipocytes. Mol Endocrinol, v.14, p.1557-1569, 2000.

ERDEI, N., et al. High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. Am J Physiol Heart Circulatory Physiol, v.291, p.H2107-H2115, 2006.

EVANS, J.L., MADDUX B.A, GOLDFINE I.D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. Antioxid Redox Signal, v.7, n.7–8, p.1040–1052, 2005.

EVANS, J.L., et al. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? Diabetes, v.52, n.1, p.1–8, 2003.

FACCHINI, F.S et al. Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and age-related diseases? FreeRadic Biol Med, v.29, n.12, p.1302–1306, 2000.

FEITOSA, M.C., et al. Plasma concentration of IL-6 and TNF- $\alpha$  and its relationship with zincemia in obese women. Rev Assoc Med Bras, v.59, n.5, p.429-34, 2013.

FERRARI, C.K.B; FRANÇA E.L; HONORIO-FRANÇA, A.C. Nitric oxide, health and disease. J Appl Biomed, v.7, p.163-73, 2009.

FINCK, B.N., KELLY, D.P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. J Clin Invest, v.116, p.615-622, 2006.

FINGERLE, G. et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. Blood, v.82, p. 3170-6, 1993.

FINKELSTEIN, E.A., et al. Obesity and Severe Obesity Forecasts Through 2030. Am J Prev Med, v. 42, n.6, p.563-570, 2012.

FISHER, G., et al. High Intensity Interval- vs Moderate Intensity- Training for Improving Cardiometabolic Health in Overweight or Obese Males: A Randomized Controlled Trial. PLOS ONE, v.10, n.10:e0138853, 2015.

FLÜCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. Rev Physiol Biochem Pharmacol, v.146, p.159-216, 2003.

FOX, T.E., et al. Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. J. Biol. Chem, v.282, p.12450–12457, 2007.

FRANKENBERGER, M. et al. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. Blood, v.87, p.373–7, 1996.

FROSIG, C., et al. Effects of endurance exercise training on insulin signalling in human skeletal muscle – interactions at the level of PI3-K, Akt and AS160. Diabetes, v.56, p. 2093–2102, 2007.

FUJIOKA, S., et al. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. Metabolism, v. 36, n.1, p. 54–59, 1987.

FURUKAWA, N., et al. Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. Cell Metab, v.2, p.119 -129, 2005.

FURUKAWA, S., et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest, v.114, p. 1752–1761, 2004.

GAITANOS, G.C.; WILLIAMS, C.; BOOBIS, L.H.; BROOKS, S. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. J Appl Physiol, v. 75, p.712–719, 1993.

GARLANDA C, DINARELLO CA, MANTOVANI A. The interleukin-1 family: back to the future. Immunity, v.39, n.6, p.1003-18, 2013.

GIBALA, M.J., et al. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. J Physiol, v.590, p.1077–1084, 2012.

GIBALA, M.J., LITTLE J.P. Just HIT it is a time-efficient exercise strategy to improve muscle insulin sensitivity. J Physiol, v.588, p. 3341–3342, 2010.

GIBALA, M.J. High-intensity interval training: a time-efficient strategy for health promotion? Curr Sports Med Rep, v.6, n.4, p.211-3, 2007.

GIBALA, M.J., et al. Short-term sprint interval *versus* traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. J Physiol, v.575, n.3, p.901-911, 2006.

GIBALA, M.J; GILLEN, J.B; PERCIVAL, M.E. Physiological and health-related adaptations to low-volume interval training: influences of nutrition and sex. Sports Med, v.44 , Suppl 2:S127-37, 2014.

GIBALA, M.J.; JONES, A.M. Physiological and Performance Adaptations to High-Intensity Interval Training. Nestlé Nutr Inst Workshop Ser, v. 76, p. 51–60, 2013.

GILLEN, J.B., et al. Interval training in the fed or fasted state improves body composition and muscle oxidative capacity in overweight women. Obesity, v.21, p.2249-2255, 2013.

GILLEN, J.B., et al. Three Minutes of All-Out Intermittent Exercise per Week Increases Skeletal Muscle Oxidative Capacity and Improves Cardiometabolic Health. Plos One, v.9, n.11, e111489, 2014.

GIRAUD, J., et al. Phosphorylation of Irs1 at SER-522 inhibits insulin signaling. Mol Endocrinol, v.21, p.2294-2302, 2007.

GIST, N.H., et al. Sprint Interval Training Effects on Aerobic Capacity: A Systematic Review and Meta-Analysis. Sports Med, v.44, n.2, p.269-79, 2014.

GLASS, G. A.; GERSHON, D. Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: loss of superoxide dismutase activity associated with increases in catalytically defective forms. Biochem Biophys Res Commun, v.103, n.4, p.1245-53, 1981.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. J Appl Physiol, v.103, n.2, p.693-9, 2007.

GRAGE-GRIEBENOW, E; FLAD, H.D; ERNST, M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. J Leukocyte Biol, v.69, p.11-20, 2001.

GRANATA, C., et al. Training intensity modulates changes in PGC-1α and p53 protein content and mitochondrial respiration, but not markers of mitochondrial content in human skeletal muscle. FASEB J, v.30, n.2, p.959-70, 2016.

GUIRAUD, T., et al. High-intensity interval training in cardiac rehabilitation. Sports Med, v. 42, n.7, p.587-605, 2012.



GUPTE, A.A. et al. Heat Treatment Improves Glucose Tolerance and Prevents Skeletal Muscle Insulin Resistance in Rats Fed a High-Fat Diet. Diabetes, v. 58, p.567–578, 2009.

GUTTERIDGE, J.M; HALLIWELL, B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. Biochem Biophys Res Commun, v.393, n. 4, p.561-4, 2010.

HAGHANI, K., et al. TNF- $\alpha$  knockdown alleviates palmitate-induced insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. Biochem Biophys Res Commun, v.460, n.4, p. 977-82, 2015.

HANCER, N.J., et al. Insulin and Metabolic Stress Stimulate Multisite Serine/Threonine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 and Inhibit Tyrosine Phosphorylation. J Biol Chem, v.289, p.12467-12484. 2014.

HAWLEY, J.A. e LESSARD, S.J. Mitochondrial function: use it or lose it. Diabetologia, v.50, p. 699–702, 2007.

HAWLEY, J.A., HARGREAVES, M.; ZIERATH, J.R. Signalling mechanisms in skeletal muscle: role in substrate selection and muscle adaptation. Essays Biochem, v.42, p.1-12, 2006.

HE, J. et al. Interleukin-1 $\alpha$  inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol, v.20, n.1, p.114-24, 2006.

HEILBRONN, L.K. et al. Markers of Mitochondrial Biogenesis and Metabolism Are Lower in Overweight and Obese Insulin-Resistant Subjects. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 92, n.4, p.1467–1473, 2007.

HEILBRONN, L.K; CAMPBELL, L.V. Adipose Tissue Macrophages, Low Grade Inflammation and Insulin Resistance in Human Obesity. Current Pharmaceutical Design, v.14, p.1225-1230, 2008.

HELGERUD, J., et al. Aerobic high intensity intervals improve VO<sub>2</sub>max more than moderate training. Med Sci Sports Exerc, v.39, p.665–671, 2007.

HENSTRIDGE, D.C., et al: The relationship between heat shock protein 72 expression in skeletal muscle and insulin sensitivity is dependent on adiposity. Metabolism Clinical and Experimental, 2010.

HENSTRIDGE, D.C., et al. Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. Diabetes, v.63, n.6, p.1881-94, 2014.

HEYDARI, M., FREUND, J., BOUTCHER, H. The effect of high-intensity intermittent exercise on body composition of overweight young males. Journal of Obesity, 2012.

HIROSUMI, J., et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature, v.420, p. 333–336, 2002.

HOEG, L.D., et al. Lipid-induced insulin resistance affects women less than men and is not accompanied by inflammation or impaired proximal insulin signaling. Diabetes, v. 60, p. 64–73, 2010.

HØJLUND, K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. Dan Med J, v.61, n.7, B4890, 2014.

HOLLOWAY, G.P., et al. Skeletal muscle mitochondrial FAT/CD36 content and palmitate oxidation are not decreased in obese women. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.292, n.6, 1782-9, 2007.

HOLLOWAY, G.P., et al. PGC-1alpha's relationship with skeletal muscle palmitate oxidation is not present with obesity despite maintained PGC-1alpha and PGC-1beta protein. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.294, E1060–E1069, 2008.

HOLLOWAY, G.P.; BONEN, A.; SPRIET, L.L. Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals. Am J Clin Nutr, v.89, p.455S–62S, 2009.

HOOD, M.S., et al. Low-volume interval training improves muscle oxidative capacity in sedentary adults. Med Sci Sports Exerc, v.43, n.10, p.1849-56, 2011.

HOOPER, P.L. Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus. New Eng J Med, v.341, p.924–925, 1999.

HOTAMISLIGI, G.S., SPIEGELMAN, B.M. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. Diabetes, v.43, n.11, p.1271-8, 1994.

HOTAMISLIGIL, G.S., et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest, v.95, p. 2409-2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, G.S., SHARGILL, N.S., SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science, v.259, p. 87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G.S., et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. Science, v.271, p.665-668, 1996.

HOWLETT, K.F., et al. Insulin-stimulated insulin receptor substrate-2-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity is enhanced in human skeletal muscle after exercise. Metabolism Clinical and Experimental, v. 55, n. 8, p. 1046-1052, 2006.

HU, W., et al. Palmitate increases sphingosine-1-phosphate in C2C12 myotubes via upregulation of sphingosine kinase message and activity. J Lipid Res, v.50, p.1852-1862, 2009.

HUANG, J.T., et al. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. Nature, v. 400, 378-382, 1999.

HWANG, C.L., WU, Y.T, CHOU CH. Effect of aerobic interval training on exercise capacity and metabolic risk factors in people with cardiometabolic disorders: a meta-analysis. J Cardiopulm Rehabil Prev, v.31, n.6, p.378-85, 2011.

HWANG, S.L., et al. Inhibitory cross-talk between the AMPK and ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. Br J Pharmacol, v.169, n.1, p. 69-81, 2013.

INOUCHI, T. et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes, v.49, n.11, p.1939-1945, 2000.

ITANI, S.I., et al. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. Diabetes, v.49, n.8, p.1353-8, 2000.

ITANI, S.I., et al. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. Diabetes, v.51, p.2005–2011, 2002.

JAGER, J., et al. Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. Diabetologia, v.54, p.180-189, 2011.

JAGER, S., et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, p. 12017–12022, 2007.

JELLEYMAN, C., et al. The effects of high-intensity interval training on glucose regulation and insulin resistance: a meta-analysis. Obesity Reviews, v.16, n.11, p. 942–961, 2015.

JOVE, M., et al. Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappaB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells. Endocrinology, v.146, p.3087-3095, 2005.

JUSTIN, I., et al. Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. Nature, v. 28; p.1116–1120, 2007.

KADOWAKI, T., et al. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. N Engl J Med, v.330, p. 962–968, 1994.

KALUPAHANA, N.S; MOUSTAID-MOUSSA, N; CLAYCOMBE, K.J.Immunity as a link between obesity and insulin resistance. Mol Aspects Med, v. 33, n.1, p.26-34, 2012.

KAMATA, H., et al. Reactive oxygen species promote TNF alpha induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. Cell, v.120, p.649-661, 2005.

KAMEI, N., et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein–1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. J BiolChem, v.281, p.26602-14, 2006.

KANNEL, W.B., et al. Risk Stratification of Obesity as a Coronary Risk Factor. Am J Cardiol, v.90, p.697–701, 2002.

KARLSSON, H.K., et al. Insulin signaling and glucose transport in skeletal muscle from first-degree relatives of type 2 diabetic patients. Diabetes, v.55, p.1283-1288, 2006.

KAWANAKA, N. et al. CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, v.46, p.2578–86, 2002.

KEANE, K.N., et al. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction. Oxid Med Cell Longev, v.201, p.5181643, 2015.

KEATING, E.S., et al. Continuous Exercise but Not High Intensity Interval Training Improves Fat Distribution in Overweight Adults. Journal of Obesity, v.2014, 2014.

KELLY, D. P., SCARPULLA, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. Genes Dev, v. 18, p.357-368, 2004.

KELLEY, D.E., et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. Diabetes, v.51, p. 2944–2950, 2002.

KELLEY, D.E., et al. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle, J Clin Invest, v.92, p.91–98, 1993.

KELLEY, D.E.; SIMONEAU, J.A. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest, v.94,p. 2349–2356, 1994.

KESSLER, H.S., et al. The Potential for High-Intensity Interval Training to Reduce Cardiometabolic Disease Risk. Sports Med, v.42, n.6, p.489-509, 2012.

KIANG, J.G., TSOKOS GC: Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacol Ther, v.80, n.2, p.183-201, 1998.

KIM, Y.B., et al. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes.J Clin Invest, v.104, n.6, p.733-41, 1999.

KIM, J.K., et al. PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. J ClinInvest, v.114, p.823– 827, 2004.

KIM, J; WEI, J; SOWERS, JR. Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance. Circ Res, v.102, p.401-414, 2008.

KIENS, B., Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. Physiol Rev, v.86, n.1, p. 205-43, 2006.

KING, N.A., et al. Metabolic and behavioral compensatory responses to exercise interventions: barriers to weight loss. Obesity, v15, p. 1373-1383, 2007.

KONOPKA, A.R., et al. Defects in Mitochondrial Efficiency and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Emissions in Obese Women Are Restored to a Lean Phenotype With Aerobic Exercise Training. Diabetes, v.64, n.6, p. 2104-2115, 2015.

KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. Nature, v. 404, n.6, 2000.

KORKIAKANGAS, E.E., ALAHUHTA, M.A., LAITINEN, J.H. Barriers to regular exercise among adults at high risk or diagnosed with type 2 diabetes: a systematic review. Health Promotion International, v.24, p.416–427, 2009.

KRAMER, C.K., et al. Emerging parameters of the insulin and glucose response on the oral glucose tolerance test: reproducibility and implications for glucose homeostasis in individuals with and without diabetes. Diabetes Res Clin Pract, v.105, n.1, p.88-95, 2014.

KRAMER, H.F., et al. AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. J Biol Chem, v.281, n.42, p.31478-85, 2006.

KRINNINGER, P., et al. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. J Clin Endocrinol Metab, v.99, n.7, p.2500-9, 2014.

KURUEZ, I., et al. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. Diabetes, v.51, p.1102-1109, 2002.

LAGOUGE, M., et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . Cell, v.127, p.1109–1122, 2006.

LEE, Y.H., et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. J BiolChem, v.278, p.2896–2902, 2003.

LEGGATE, M., et al. Determination of inflammatory and prominent proteomic changes in plasma and adipose tissue after high-intensity intermittent training in overweight and obese males. J Appl Physiol, v. 112, n.8, p. 1353–1360, 2012.

LEHMAN, J.J., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. J Clin Invest, v.106, p.847–856, 2000.

LI, J.P., DEFEA, K., ROTH, R.A. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. J Biol Chem, v.274, p.9351–9356, 1999.

LITTLE, J.P., et al: A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. J Physiol, v.588, p. 1011–1022, 2010.

LITTLE, J.P., et al: Low volume high-intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes. J Appl Physiol, v.111, p.1554– 1560, 2011.

LIU, Y., et al. Human skeletal muscle HSP70 response to training in highly trained rowers. J Appl Physiol, v.86, n.1, p.101-104, 1999.

LONG, Y.C; WIDEGREN, U; ZIERATH JR.Exercise-induced mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle. Proc Nutr Soc, v.63, n.2, p.227-32, 2004.

LYNCH, L., et al. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. Immunity, v. 37, p. 574–87, 2012.

LYNCH, L.A., et al. Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? Obesity, v.17, n.3, p.601-5, 2009.

MACDOUGALL, J.D., et al. Muscle performance and enzymatic adaptations to sprint interval training. J Appl Physiol, v.84, p.2138–42, 1998.

MÁCHOVÁ, L. et al. The impact of obesity on cardiovascular disease mortality in the District Sumperk, Czech Republic. Int J Public Health, v.52, p.255–258, 2007.

MAGALHÃES, F.C. et al. Heat and exercise acclimation increases intracellular levels of Hsp72 and inhibits exercise-induced increase in intracellular and plasma Hsp72 in humans. Cell Stress Chaperones, v.15, n.6, p.885-95, 2010.



MANSON, J.E., et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med, v. 322, p. 882–889, 1990.

MANTOVANI, A; SICA, A; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. Immunity, v.23, p.344–346, 2005.

MARCINKO, K., et al. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity. Molecular Metabolism, 2015.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol, v. 17, n. 1, p. 24–38, 2003.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry, v. 47, p. 469-474, 1974.

MATOS, A., et al. Acute exercise reverses TRB3 expression in the skeletal muscle and ameliorates whole body insulin sensitivity in diabetic mice. Acta Physiologica, v. 198, n. 1, p. 61-69, 2010.

MATOS, M.A., et al. Exercise reduces cellular stress related to skeletal muscle insulin resistance. Cell Stress Chaperones, v.19, n.2, p.263–270, 2014.

MATTHEWS, D.R., et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia, v. 28, p.412-19, 1985.

MELANSON, E.L., et al. Resistance to exercise-induced weight loss: compensatory behavioral adaptations. Med Sci Sports Exerc, v. 45, p.1600-1609, 2013.

MENSINK, M., et al. Improved skeletal muscle oxidative enzyme activity and restoration of PGC-1 $\alpha$  and PPAR $\beta/\delta$  gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabetes mellitus. Int J Obes, v.31, p.1302–1310, 2007.

METCALFE, R.S., et al. Towards the minimal amount of exercise for improving metabolic health: beneficial effects of reduced-exertion high-intensity interval training. Eur J Appl Physiol, v.112, p.2767–75, 2011.

MEYER, T.N e DA SILVA A. L. Resposta celular ao estresse. Rev Assoc Med Bras, v.45 n.2, 1999.

MIDORI FUJISHIRO, M., et al. Three Mitogen-Activated Protein Kinases Inhibit Insulin Signaling by Different Mechanisms in 3T3-L1 Adipocytes. Molecular Endocrinology, v. 17, n. 3, p.487–497, 2013.

MILNE, K.J., NOBLE, E.G. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. J Appl Physiol, v.93, n.2, p.561-8, 2002.

MIZUNO, C.H. O custo da obesidade no Brasil: A importância da avaliação econômica na tomada de decisão em políticas públicas de prevenção em saúde. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao bacharelado em Gestão de Políticas Públicas da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

MOESCHEL K, et al. Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser(318) in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. J Biol Chem, v.279, p.25157-25163, 2004.

MOGENSEN, M. et al. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. Diabetes, v.56, p. 1592–1599, 2007.

MOOTHA, V.K., et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. Nat Genet, v.34, p. 267–273, 2003.

MORINO, K., PETERSEN, K.F., SHULMAN, G.I. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. Diabetes, v.55 (suppl 2), S9 - S15, 2006.

MORINO, K., et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. J Clin Invest, v.115, p.3587–3593, 2005.

MORTON, J.P., et al. Exercise training–induced gender-specific heat shock protein adaptations in human skeletal muscle. Muscle & Nerve, v.39, n.2, p. 230–233, 2009.

MOTHE, I., VAN OBBERGHEN, E. Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 on Multiple Serine Residues, 612, 632, 662, and 731, Modulates Insulin Action. The Journal of Biological Chemistry, v. 271, n. 19, p.11222-11227, 1996.

MUSTELIN, L., et al. Acquired obesity and poor physical fitness impair expression of genes of mitochondrial oxidative phosphorylation in monozygotic twins discordant for obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.295, E148–E154, 2008.

MYERS, J. Essentials of cardiopulmonary exercise testing. 1st ed. Champaign, IL: Human Kinetics, 1996.

MYERS, J; BELLIN, D. Ramp exercise protocols for clinical and cardiopulmonary exercise testing. Sports Med, v .30, p.23–29, 2000.

NAKAMURA, T., et al. “Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men,” Atherosclerosis, v.107, n.2, p. 239–246, 1994.

NELSON, D. P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with Molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). Analytical Biochemistry, v.49, p.474-478, 1972.

NGUYEN, M.T., et al. JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. The Journal of biological chemistry, v.280, p.35361-35371, 2005.

NIETO-VAZQUEZ I, et al. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. Diabetes,v.57, n.12, n.3211-21, 2008.

NISHIMURA, S. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nature Medicine, v.15, n.8, 2009.

O’GORMAN, D.J., et al. Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. Diabetologia, v.49, p.2983-2992, 2006.

O’ROURKE, R.W., et al. Alterations in T-Cell Subset Frequency in Peripheral Blood in Obesity.Obesity Surgery, v.15, p. 1463-1468, 2005.

ODEGAARD, J.I; CHAWLA, A. Alternative macrophage activation and metabolism. Annu Rev Pathol, v.6, p.275-297, 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. Analytical Biochemistry, v.95, p.351-358, 1979.

O'LEARY, VB., et al. Exercise-induced reversal of insulin resistance in obese elderly is associated with reduced visceral fat. J Appl Physiol, v.100, n.5, p.1584-9, 2006.

OLEFSKY, J.M; GLASS, C.K. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. Annu Rev Physiol, v.72, p.219-46, 2010.

OLLERTON, R.L., et al. Day-to-day variability of fasting plasma glucose in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. Diabetes Care, v. 22, n. 3, 1999.

OLSZANECKA-GLINIANOWICZ, M., et al. Plasma visfatin and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) levels in metabolic syndrome. Kardiol Pol, v.69, n.8, p.802-7, 2011.

OLUSI, S.O. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. International Journal of Obesity, v.26, p.1159-1164, 2002.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS); 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Obesity and overweight. Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

O'SHEA, D., et al. Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. PLoS One, v.5, n.1, e8660, 2010.

PARK, H.S; PARK, J.Y; YU, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- $\alpha$  and IL-6. Diabetes Research and Clinical Practice, v.69, p.29-35, 2005.

PATSOURIS, D., et al. Insulin Resistance is Associated with MCP1-Mediated Macrophage Accumulation in Skeletal Muscle in Mice and Humans. Plos One, v. 9, n.10, 2014.

PATTI, M.E., et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans withinsulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. Proc Natl Acad Sci USA, v.100, p.8466–8471, 2003.

PAULI, J. R., *et al.* A. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. Mechanisms of Ageing and Development, v. 131, n. 5, p. 323-329, 2010.

PEARSON, G., et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev, v.22, p.153-183, 2001.

PEDERSEN, B.K., AND FEBBRAIO, M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. Nat Rev Endocrinol, v. 8, p.457–465, 2012.

PERRY, C.G.R., et al. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. J Physiol, v.588 Pt 23), p.4795-4810, 2010.

PESSIN, J.E; SALTIEL A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. Journal of Clinical Investigation, v.106, p.165-169, 2000.

PESSLER, D.; RUDICH, A.; BASHAN, N. Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter. Diabetologia, v.44, p.2156–2164, 2001.

PHIELIX, E., et al. Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients.Diabetes, v.57, p. 2943-2949, 2008.

PHILLIPS, L.S., et al. We Can Change the Natural History of Type 2 Diabetes. Diabetes Care,v.37, n. 10, p.2668-2676, 2014.

PIMENTA, A.S., et al. Prolonged exposure to palmitate impairs fatty acid oxidation despite activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells. J Cell Physiol, v.217, p.478-485, 2008.

POITOU, C. et al. CD14dimCD16+ and CD14++CD16+ Monocytes in Obesity and During Weight Loss Relationships With Fat Mass and Subclinical Atherosclerosis. Arterioscler ThrombVasc Biol, v.31, p.2322-2330, 2011.

POGOZELSKI, A. R., et al. p38 $\gamma$  mitogen-activated protein kinase is a key regulator in skeletal muscle metabolic adaptation in mice. PLoS ONE, v.4, e7934, 2009.

POLESEL, J., et al. Cigarette smoking and endometrial cancer risk: the modifying effect of obesity. Eur J Cancer Prev, v.18, n.6, p.476-81, 2009.

POOLE, D.C. et al. Validity of criteria for establishing maximal O<sub>2</sub> uptake during ramp exercise tests. Eur J Appl Physiol, v.102, p.403–410, 2008.

POWELL, D.J., et al. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKC $\zeta$ -dependent mechanism. Mol Cell Biol, v.23, p.7794-7808, 2003.

PUIGSERVER, P., et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell, v.92, p.829–839, 1998.

QATANANI, M; LAZAR, M.A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. Genes & Development, v. 2, p.1443–1455, 2007.

RAGHEB, R., et al. Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: Evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. Biochem Biophys Res Commun, v.389, n.2, n. 211–216, 2009.

REINDELL H, ROSKAMM H. Ein Beitrag zu den physiologischen Grundlagen des Intervall training unter besonderer Berücksichtigung des Kreilaufes. Schweiz Z Sportmed, v.7, p. 1-8, 1959.

REN, J.M., et al. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. J Biol Chem, v.269, p.14396–14401. 1994.

RITOV, V.B., et al. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. Diabetes, v. 54, p. 8–14, 2005.

ROGACEV, K.S. et al. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *European Heart Journal*, v. 31, p.369–376, 2010.

RONCOLETA, F. Status oxidativo e inflamatório em mulheres obesas: relação com variáveis antropométricas, lipídicas e clínicas. Programa de Pós-Graduação em Medicina/Biomedicina do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, 2012.

RÖNN, T., et al. Genetic variation in ATP5O is associated with skeletal muscle ATP5O mRNA expression and glucose uptake in young twins. *PLoS One*, v.4, e4793, 2009.

ROSE, A. J., KIENS, B., RICHTER, E. A.  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol*, v.574, p.889-903, 2006.

ROSE, A.J.; HARGREAVES, M. Exercise increases  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II activity in human skeletal muscle. *J Physiol*, v.553, p.303–309, 2003.

ROSE, A. J., et al. Effect of endurance exercise training on  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase II expression and signalling in skeletal muscle of humans. *The Journal of Physiology*, v.583, p.785-795, 2007.

ROSEN, P., et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev*, v.17 n.3, p.189–212, 2001.

ROSEN, E.D; SPIEGELMAN, B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, v.444, p.847–53, 2006.

ROTTER, V., NAGAEV I, SMITH U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*, v.278, n.46, p.45777-84, 2003.

RUDERMAN N.B., et al. Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes*, v.55, Suppl 2, p.S48-54, 2006.

RUSSELLA, A.P., et al. Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? FEBS Letters, v.551, p.104-106, 2003.

RYDER, E., et al. Increased proinflammatory markers and lipoperoxidation in obese individuals: Initial inflammatory events? Diabetes Metab Syndr, v.9, n.4, p.280-6, 2015.

SABIO, G; DAVIS, R.J. cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. Trends BiochemSci, v.35, n.9, p.490–496, 2010.

SAKAMOTO,K.; HOLMAN,G.D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.295, n.1, E29-E37, 2008.

SAMJOO, I.A., et al. effect of endurance exercise on both skeletal muscle and systemic oxidative stress in previously sedentary obese men. Nutr Diabetes, v.3, n.9, e88, 2013.

SASAI, H., et al. Relationship Between Obesity and Incident Diabetes in Middle-Aged and Older Japanese Adults: The Ibaraki Prefectural Health Study. Mayo ClinProc, v.85, n.1, p.36-40, 2010.

SAWYER, B.J., Effects of eight weeks of high-intensity interval training on blood glucose regulation, endothelial function, and visceral fat in obese adults. Arizona State University, 2013, 177 pages.

SAWYER, B.J., et al. Effects of high-intensity interval training and moderate intensitycontinuous training on endothelial function and cardiometabolicrisk markers in obese adults. J Appl Physiol, v.121, p.279-288, 2016.

SCALZO, R.L., et al. Greater muscle protein synthesis and mitochondrial biogenesis in males compared with females during sprint interval training. FASEB J, v.28, n.6, p.2705-14, 2014.

SCHELL, M.T., et al. Heat shock inhibits NF-kB activation in a dose- and time-dependent manner. J Surg Res, v.129, n.1, p.90-3, 2005.

SCHENK S., SABERI M., OLEFSKY J.M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. The Journal of clinical investigation, v.118, p.2992–3002, 2008.



SCHIPPER, H.S., et al. Natural killer T cells in adipose tissue prevent insulin resistance. J Clin Invest, v.122, p.3343–54, 2012.

SCHJERVE, I.E., et al. Both aerobic endurance and strength training programmes improve cardiovascular health in obese adults. Clin Sci, v.115, p. 283-293, 2008.

SCHMITZ-PEIFFER, C., et al. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. Diabetes, v.46, p.169–78, 1997.

SCHRAUWEN-HINDERLING, V.B., et al. Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched controls. Diabetologia, v.50, p.113-120, 2007.

SELL, H., et al. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. Diabetes, v.58, p.2731–40, 2009.

SENN, J.J. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. The Journal of biological chemistry, v.281, p.26865–26875, 2006.

SHERWOOD N.E, JEFFERY R.W. The behavioral determinants of exercise: implications for physical activity interventions. Ann Rev Nutr, v.20, p.21–44, 2000.

SIEGEL, E.M., et al. The effects of obesity and obesity-related conditions on colorectal cancer prognosis. Cancer Control, v.17, n.1, p.52-7, 2010.

SIEGEL, R., et al. Colorectal cancer statistics, 2014. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v.64, n.2, p.104–117, 2014.

SIMONEAU, J.A.; KELLEY, D.E. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. J Appl Physiol, v.83, p.166–171, 1997.

SLOTH, M., et al. Effects of sprint interval training on VO<sub>2</sub>max and aerobic exercise performance: A systematic review and meta-analysis. Scand J Med Sci Sports, v.23, n.6, e341-52, 2013.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. Anal.Biochem., v.150, p. 76-86, 1985.

SMITH-RYAN, A.E. Enjoyment of high-intensity interval training in an overweight/obese cohort: a short report. Clin Physiol Funct Imaging, 2015.

SMODLAKA VN. Use of the interval work capacity test in the evaluation of severely disabled patients. J Chronic Dis, v.25, p.345–52, 1972.

SOLINAS, G., et al. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin receptor substrates. Proc Natl Acad Sci, v.103, p.16454- 16459, 2006.

SOLINAS, G.; KARIN, M. JNK1 and IKK $\beta$ : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. FASEB J, v. 24, p.2596–2611, 2010.

SPARKS, L.M., et al. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. Diabetes, v.54, p.1926-1933, 2005.

STRACZKOWSKI, M, et al. Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. Diabetologia, v.50, p.2366-2373, 2007.

STUART, C.A., et al. Insulin resistance and muscle insulin receptor substrate-1 serine hyperphosphorylation. Physiol Rep, v.2, n.12, e12236, 2014.

STUMVOLL, M; GOLDSTEIN, B.J; VAN HAEFTEN, T.W.Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet, v. 365, n.9467, p.1333-46, 2005.

STUTTS, W.C. Physical activity determinants in adults.Perceived benefits, barriers, and self-efficacy. AAOHN J, v.50, p.499-507, 2002.

SZENDROEDI, J., et al. Impaired mitochondrial function and insulin resistance of skeletal muscle in mitochondrial diabetes. Diabetes Care, v.32, p.677-679, 2009.

TABATA, I., et al. Effects of moderate-intensity endurance and high-intensity intermittent training on anaerobic capacity and VO<sub>2</sub>max. Med Sci Sports Exerc. v.28, n.10, p.1327-30, 1996.

TANIGUCHI, C.M; EMANUELLI, B.; C. RONALD KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. Nature Reviews, v.7, 2006.

TISSIÈRES, A; MITCHELL, H.K; TRACY, U.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. J Mol Biol, v.84, n.3, p.389-98, 1974.

TJØNNA, A.E., et al. Aerobic interval training reduces cardiovascular risk factors more than a multitreatment approach in overweight adolescents. Clin Sci, v.116, p. 317-326, 2009.

TJØNNA, A., et al. Low- and high-volume of intensive endurance training significantly improves maximal oxygen uptake after 10-weeks of training in healthy men. PLoS One, v.8, n.5, e65382, 2013.

TRAYHURN, P., WOOD, I.S. Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Br J Nutr, v.92, p.347–55, 2004.

TSAI, A.G., WILLIAMSON, D.F., GLICK, H.A. Direct medical cost of overweight and obesity in the USA: a quantitative systematic review. Obes Rev, n.12, v.1, p.50-61, 2011.

TSEKOURAS, Y.E., et al. High-intensity interval aerobic training reduces hepatic very lowdensity lipoprotein-triglyceride secretion rate in men. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.295, E851-858, 2008.

TURNER, R.C., et al. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. Metabolism, v.28, p.1086–1096, 1979.

UCHIYAMA, M., MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Analytical biochemistry, v.86, p.271-278, 1978

UM, S.H., et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. Nature, v.431, p.200 -205, 2004.

URAKAWA, H., et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. J Clin Endocrinol Metab, v.88, n.10, p.4673–4676, 2003.

UYSAL, K.T. et al. Protection from obesity- induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. Nature, v.389, p.610–614, 1997.

VALLADA, E.P. Manual de Técnicas Hematológicas. São Paulo: Atheneu, 1999. 423p.

VALLERIE, S.R E HOTAMISLIGIL, G.S.The Role of JNK Proteins in Metabolism. Sci Transl Med, v. 2, n.60, p. 60, 2010.

VEGA, R. B., HUSS, J. M., KELLY, D. P. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator- activated receptor  $\alpha$  in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. Mol Cell Biol, v.20, p.1868-1876, 2000.

Vigilância Alimentar e Nutricional - Sisvan: orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde /[Andressa Araújo Fagundes et al.]. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

WALLMAN, K.E.T., al.The effects of two modes of exercise on aerobic fitness and fat mass in an overweight population.Res Sports Med, v.17, n3, p.156-70. 2009.

WEERD, K.V.D, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. Diabetes, v.61, p.401–408, 2012.

WEINSIER, R.L., et al. The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity.Am J Med, v.105, n.2, p.145-50, 1998.

WEISBERG, S.P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest, v.112, p.1796–1808, 2003.

WEST, I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes.Diabet Med, v. 17, n.3, p.171-80, 2000

WESTON K.S; WISLØFF U; COOMBES JS. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. Br J Sports Med, v.48, p.1227–1234, 2014.

WHYTE, L.J., GILL, J.M., CATHCART, A.J. Effect of 2 weeks of sprint interval training on health-related outcomes in sedentary overweight/ obese men. Metabol, v.59, p.1421–8, 2010.

WILLETT W, STAMPFER MJ.Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. Am J Epidemiol, v.124, n.1, 17-27. 1986

WINER, D.A., et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. Nat Med, v.17, p.610–617, 2011.

WINER, S., et al.: Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. Nat Med, v.15, n.8, p.921-9, 2009.

WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nat Chem Biol, v.4, p. 278–286, 2008.

WISSE, B.E. The Inflammatory Syndrome. The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. J Am Soc Nephrol, v. 15, p. 2792–2800, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO; 1998

WRETMAN, C., et al Effects of concentric and eccentric contractions on phosphorylation of MAPK (erk1/2) and MAPK(p38) in isolated rat skeletal muscle. J Physiol, v.535, p.155-164, 2001.

WRIGHT, D. C., et al. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. J Biol Chem, v.282, p.18793-18799, 2007.

WRIGHT, D.C., et al. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 $\alpha$  expression. J Biol Chem, v.282, p.194–199, 2007.

WU, L.; VAN KAER, L. Contribution of lipid-reactive natural killer T cells to obesity-associated inflammation and insulin resistance. Adipocyte, v.2, n.1, p.12–16, 2013.

WU, L., et al. Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. Proc Natl Acad Sci USA, v.109, E1143–52, 2012.

WU, Z., et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell, v.98, p.115–124, 1999.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest, v.112, p.1821–1830, 2003.

YAMADA, P.M., et al. Effect of heat acclimation on heat shock protein 72 and interleukin-10 in humans. J Appl Physiol, n.103, p.1196–204, 2007.

YE, J; GAO, Z; YIN, J; HE, Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of *ob/ob* and dietary obese mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.293, p. E1118–E1128, 2007.

YESILBURSA, D., et al. Lipid peroxides in obese patients and effects of weight loss with orlistat on lipid peroxides levels. Int J Obes, v.29, n.1, p.142–5, 2005.

YOUNG, I.S; WOODSIDE J.V. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol, v.54, p.176–86, 2001.

YU, C.L., et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. J Biol Chem, v.277, p.50230–50236, 2002.

YU, L. *et al.* PKC $\theta$  inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser1101. The Journal of Biological Chemistry, v.279, p.45304–45307, 2004.

ZAMORA, M., VILLENA, J.A. Targeting mitochondrial biogenesis to treat insulin resistance. Curr Pharm Des, v.20, n.35, p.5527–57, 2014.

ZHANG, K., KAUFMAN, R.J. From endoplasmicreticulum stress to the inflammatory response. Nature, v.454, p.455-462, 2008.

ZHANG, Y., et al. Multiple signaling pathways regulate contractile activity-mediated PGC-1 $\alpha$  gene expression and activity in skeletal muscle cells. Physiol Rep, v.2, n.5, p. e12008, 2014.

ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. Immunol Today, v. 17, p.424–8, 1996.

## ANEXO A

	<b>Comitê de Ética em Pesquisa</b>	
---	------------------------------------	---

<b>PARECER CONSUBSTANCIADO</b>	<b>Nº de protocolo no Comitê:</b> <b>054/10</b>
<input checked="" type="checkbox"/> <b>PROJETO DE PESQUISA</b>	
<input type="checkbox"/> <b>TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO</b>	

**I - Identificação:**

- ✓ Título do projeto: O EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO EM VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR E NA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 72 (Hsp72) DE INDIVÍDUOS OBESOS COM RESISTÊNCIA À INSULINA
- ✓ Pesquisador responsável: Dr. Fabiano Trigueiro Amorim - Doutor
- ✓ Instituição responsável pela realização: UFVJM
- ✓ Instituição/Local onde se realizará: Santa Casa de Misericórdia de Diamantina e UFVJM
- ✓ Área de Concentração: Ciências da Saúde/ Educação Física
- ✓ Data de apresentação ao CEP: 14/06/10

**II - Objetivos:**

Objetivo geral: Avaliar os efeitos de 12 semanas de treinamento físico aeróbico em vias de sinalização intracelular e na proteína de choque térmico 72 kda de indivíduos obesos resistentes à insulina.

Objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico nos níveis plasmático e intramuscular da proteína de choque térmico 72kda em humanos obesos resistentes à insulina.
2. Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico na ativação das proteo-quinases ativadas por mitógenos [MAP quinases - JNK, p38, ERK-1 (quinase regulada por sinal extracelular-1), ERK-2 da via de NF-kB (IKK, IκBα, NF-kB) no músculo esquelético de humanos obesos resistentes à insulina.
3. Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico na concentração plasmática e intramuscular de citocinas pró- (TNF-α, IL-1β) e antiinflamatórias (IL-10 e IL-6) em obesos resistentes à insulina.
4. Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico nos níveis de glicose e insulina plasmáticos de jejum em obesos resistentes à insulina.
5. Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico na resistência à insulina em obesos resistentes à insulina.

**III- Sumário do projeto:**

✓ **Descrição e caracterização da amostra:** Serão selecionados 09 indivíduos, do sexo masculino, com idade entre 35 e 50 anos, não fumantes, sedentários de acordo com o Questionário Internacional de Atividade Física (IPAC - Craig et al 2003) (ANEXO A), obesos (IMC entre 30 e 35 Kg/m<sup>2</sup>) e com resistência à insulina avaliada pelo índice HOMA-IR (Matthews,1985). O cálculo da amostra foi baseado no estudo de O'Leary et al., (2006) sendo utilizada a variável insulina plasmática de jejum. Através do software STATISTICA v8.0 (StatSoft, Inc) obteve-se um n de 9. Os voluntários serão recrutados por convites pessoais e avisos por escrito, explicando os fins e procedimentos da pesquisa.

✓ **Critérios de inclusão e exclusão:** Serão selecionados 09 indivíduos, do sexo masculino, com idade entre 35 e 50 anos, não fumantes, sedentários de acordo com o Questionário Internacional de Atividade Física (IPAC - Craig et al 2003) (ANEXO A), obesos (IMC entre 30 e 35 Kg/m<sup>2</sup>) e com resistência à insulina avaliada pelo índice HOMA-IR (Matthews,1985). Os voluntários deverão apresentar ainda massa corporal estável nos 3 meses anteriores a realização do estudo. Serão excluídos da amostra os indivíduos que participaram de programas de redução de peso nos últimos seis meses, utilizem medicamentos hipoglicemiantes, apresentem diagnóstico de diabetes mellitus e presença de doenças agudas ou crônicas como cardiovasculares, cerebrovasculares, hepáticas, renal, hematológica, respiratória, tireóide e câncer, diagnóstico de hipertensão (pressão arterial em repouso maior que 140/90 mmHg), história prévia de desmaio durante a prática de exercícios e/ou procedimento de coleta de sangue e alergia ao iodo. O procedimento de biópsia será realizado pelo Dr. Pope Moseley, que treinará o médico Dr. Miguel Pontes para a realização do procedimento; tal procedimento está vinculado à concessão de um auxílio financeiro ao Dr. Pope, sem o qual a biópsia não será executada.

✓ **Adequação da metodologia:** Adequada

✓ **Adequação das condições:** Adequada

**IV- Comentários do relator frente à Resolução 196/96 e complementares em particular sobre:**

- ✓ Justificativa do uso do placebo (caso haja): não se aplica
- ✓ Justificativa da suspensão terapêutica (wash out): não se aplica
- ✓ Estrutura do protocolo: adequada
- ✓ Análise de riscos e benefícios: Os voluntários serão submetidos a um programa de exercício aeróbico durante 12 semanas, com uma intensidade correspondente a 75% da captação máxima de oxigênio. Haverá um aumento progressivo no número de sessões semanais (3 a 5) e no volume (40 a 60 minutos) do exercício. A realização deste estudo implica nos seguintes riscos para os voluntários e pessoas envolvidas na execução do projeto: riscos gerais relacionados à prática da atividade física como lesões musculares e ósseas, enjôo e tontura após o teste ou exercício na esteira; de hematomas decorrentes da coleta de sangue e biópsia muscular; de cicatriz no local da biópsia; de contaminação com material biológico durante a coleta de dados, de desconforto respiratório pelo uso da máscara do espirômetro. Durante as situações experimentais os

Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Rua da Glória, 185, Centro, CEP 39100000 - Diamantina MG - Brasil (38) 35326060  
<http://www.ufvjm.edu.br/administracao/pro-reitorias/prppg/pesquisa/cep.html>



voluntários serão continuamente monitorados (frequência cardíaca e pressão arterial), o que permitirá a detecção de alterações que possam trazer prejuízo aos voluntários, permitindo, se necessário, a interrupção do procedimento. Deve-se ressaltar que as condições de controle da realização do exercício e de higiene diminuem a probabilidade de problemas para os voluntários durante o exercício. Em caso de necessidade será acionado o médico de plantão da Santa Casa de Misericórdia. A clínica escola conta também com um sistema de desfibrilação externo automático (DEA) e membros da equipe do projeto têm treinamento para utilização deste equipamento caso necessário (suporte básico à vida). Os benefícios decorrentes da realização deste projeto para os voluntários são relacionados aos efeitos do exercício físico, como melhor controle metabólico, melhor bem-estar e aumento do condicionamento cardiorrespiratório. E consequentemente, a aquisição de um fator protetor para várias doenças, como as cardiovasculares. Os benefícios deste estudo à comunidade científica consistem no conhecimento dos efeitos de exercício físico nas proteínas de choque térmico 70 kda e em sinalizadores intracelulares que interferem com a via de sinalização à insulina. Achados esses que serão de grande relevância científica, já que, na literatura não existem estudos que avaliaram o efeito do exercício físico controlado em tais parâmetros em indivíduos obesos com resistência à insulina. Adicionalmente, os resultados desse estudo poderão direcionar para possíveis os mecanismos do exercício na melhora da sensibilidade à insulina.

- ✓ Adequação do consentimento e forma de obtê-lo: Adequado
- ✓ Informação adequada quanto ao financiamento: Adequada
- ✓ Lista de centros (para estudos multicêntricos): Não se aplica
- ✓ Outros:

#### V - Pendências

#### VI- Observações

#### VII – Motivos da não aprovação

#### VIII- Parecer Consubstanciado do CEP:

- ☒ **APROVADO.** Receberá parecer e certificado do Comitê.
- ☐ **PENDENTE.** Certificado do Comitê sujeito à resolução das pendências em tempo previsto.
- ☐ **NÃO APROVADO.** Receberá apenas o parecer do CEP. Submeterá novo projeto ao Comitê.

Observações ao pesquisador:

#### Para projetos aprovados

- 1) Somente estará autorizado o início da pesquisa, após aprovação do protocolo pelo CEP.
- 2) O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- 3) O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.2), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- 4) O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- 5) Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
- 6) Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em 15/09/2011 e ao término do estudo. Considera-se como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

**IX- Data da reunião do CEP:** 15 de setembro de 2010.

Prof.ª Dr.ª Etel Rocha Vieira  
Vice-Coordenadora CPE/UFVJM

Prof.ª Agnes Maria Gomes Murtá, Ph.D.  
Coordenadora do CEP UFVJM

Prof.ª Dr.ª Agnes Maria Gomes Murtá  
Coordenadora CEP/UFVJM

## ANEXO B

### Versão brasileira do Veterans Specific Activity Questionnaire (VSAQ)

Este questionário tem como objetivo avaliar sua capacidade para realização de atividades diárias habituais. A seguir, serão apresentadas várias atividades do dia-a-dia que aumentam de modo crescente o nível de esforço e dificuldade necessários para realizá-las. Após a identificação das atividades, pense cuidadosamente e indique a primeira atividade que, se realizada por um determinado período (poucos minutos), causaria cansaço intenso, falta de ar, dor no peito ou vontade de parar por exaustão. Se você não realiza normalmente alguma das atividades em particular, tente imaginar como seria se as fizesse.

**1 MET** - Comer e vestir-se. Ficar deitado ou sentado assistindo televisão. Trabalhar sentado escrevendo, digitar no computador ou falar ao telefone.

**2 METs** - Lavar, passar ou pendurar roupas. Cozinhar, lavar pratos, mudar a roupa de cama, levar lixo para fora, regar plantas, costurar à mão. Tomar banho de chuveiro e secar-se (em pé). Caminhar da casa para o carro ou ônibus. Descer 8 degraus de escada (1 lance). Fazer compras (no mercado, no shopping). Carregar e arrumar as compras (esforço leve).

**3 METs** - Caminhar devagar (4km/h) sobre uma superfície plana um ou dois quarteirões (carregando ou não objetos com menos de 10 kg). Realizar trabalhos leves/moderados: lavar carro, lavar janelas, limpar garagem, varrer o chão, carregar criança pequena de aproximadamente 7 kg (esforço leve).

**4 METs** - Executar trabalhos leves no quintal (por exemplo: juntar e ensacar grama ou folhas de árvore). Varrer garagem, calçada ou fora de casa. Cuidar de idoso ou adulto incapacitado (ex.: ajudar a dar banho). Andar de bicicleta para trabalho ou lazer (< 16 km/h).

**5 METs** - Dançar socialmente (rápido). Caminhar, terreno plano, superfície firme, ritmo bem rápido (6,5 km/h). Caminhar carregando um peso entre 0,5 e 7 kg em subidas (ex.: pacote de arroz de 5 kg).

**6 METs** - Fazer faxina. Nadar, em lago, oceano ou rio. Caminhar (7 km/h) em terreno plano, superfície firme, ritmo extremamente rápido. Mudar móveis pesados de lugar (arrastar).

**7 METs** - Subir ladeira a pé. Futebol casual. Correr (7,5 km/h) ou nadar, em velocidade lenta, esforço leve a moderado. Carregar compras escada acima. Carregar um peso de aproximadamente 30 kg (uma criança).

**8 METs** - Correr 8 km/h, moderadamente, em superfícies planas ( $7,5 \text{ min.km}^{-1}$ ), subir escadas rapidamente. Carregar compras e pesos moderados (7 a 18 kg) subindo escadas.

**9 METs** - Andar de bicicleta em velocidade moderada. Correr 8,3 km/h ( $7,1 \text{ min. km}^{-1}$ ). Subir morros com peso de 20 kg.

**10 METs** - Nadar em ritmo acelerado, esforço vigoroso. Subir uma ladeira de bicicleta. Correr a 10 km por hora ( $6,2 \text{ min. km}^{-1}$ ). Futebol competitivo. Carregar peso entre 22 e 34 kg em subidas.

**11 METs** - Andar de bicicleta em ritmo acelerado e contínuo. Correr 11 km/h ( $5,3 \text{ min. km}^{-1}$ ) ou correr no campo (terreno irregular com subida). Nadar estilo crawl, velocidade rápida ( $70 \text{ m/min}$ ), com esforço vigoroso. Carregar uma carga pesada (ou seja, uma criança) subindo até 2 lances de escada.

**12 METs** - Correr em ritmo acelerado e contínuo (em superfície plana 2 km em tempo  $< 10$  minutos ou 12 km/h). Ciclismo estacionário (250 W), esforço muito vigoroso. Carregar peso superior a 34 kg em subida.

**13 METs** - Realizar qualquer atividade competitiva, incluindo aquelas que envolvam correr a toda velocidade (muito rápido) e de forma intermitente. Correr a aproximadamente 13 km/h ( $4,6 \text{ min.km}^{-1}$ ). Correr ou remar competitivamente, corridas de bicicleta.